



Republik
Österreich
Patentamt

(11) Nummer: AT 404 554 B

AL

(12)

PATENTCHRIFT

(21) Anmeldenummer: 770/96
(22) Anmeldetag: 29. 4.1996
(42) Beginn der Patentdauer: 15. 5.1998
(45) Ausgabetag: 28.12.1998

(51) Int.Cl.⁶ : A61K 38/48
C12Q 1/37, C07K 17/00

(73) Patentinhaber:

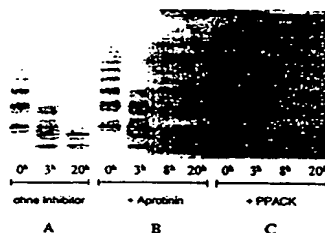
IMMUNO AKTIENGESELLSCHAFT
A-1221 WIEN (AT).

(72) Erfinder:

FURLAN MIHA DR.
BERN (CH).
LÄMMLER BERNHARD DR.
BOLLINGEN (CH).
SCHWARZ HANS PETER DR.
WIEN (AT).
TURECEK PETER DR.
KLOSTERNEUBURG WEIDLING, NIEDERÖSTERREICH (AT).
EIBL JOHANN DR.
WIEN (AT).

(54) PHARMAZEUTISCHE PRÄPARATION

(57) Beschrieben wird eine pharmazeutische Zusammensetzung, enthaltend eine Multimerase mit einer mittelbaren bzw. unmittelbaren proteolytischen Aktivität, welche vWF mit einer Singulettstruktur zu vWF mit einer Satellitenstruktur umsetzt und in Gegenwart des Serinprotease-Inhibitors DFP oder des Calpain-Protease-Inhibitors Z-Leu-Leu-Tyr-CHN₂ aktiv ist und zur Inaktivierung bzw. Abreicherung von Viren behandelt ist, sowie ein Verfahren zur Herstellung der erfindungsgemäßen Multimerase.



AT 404 554 B

Die Erfindung betrifft eine pharmazeutische Präparation enthaltend eine von Willebrand-Protease, ein Verfahren für ihre Herstellung, ihre Verwendung sowie ein Verfahren zur Bestimmung dieser Protease.

Von Willebrand-Faktor (vWF) ist ein Glykoprotein, welches in Plasma in einer Reihe von Multimeren der Größe von etwa 500 bis 20 000 Kilodalton zirkuliert. Die multimeren Formen von vWF setzen sich aus 250 kD Polypeptid-Untereinheiten zusammen, welche über Disulfidbrücken aneinander gebunden sind. vWF spielt eine Rolle bei der Bindung von Blutplättchen an das Subendothelium einer beschädigten Gefäßwand, wobei nur die größten Multimere auch haemostatische Aktivität zeigen. Es wird angenommen, daß die Endothelzellen große polymere Formen von vWF sekretieren und daß diejenigen Formen von vWF, welche ein kleineres Molekulargewicht aufweisen (low molecular weight vWF, LMW), durch proteolytische Spaltungen entstanden sind.

Die Multimeren mit großen Molekülmassen werden in den Weibel-Palade-Körpern der Endothelzellen gespeichert und nach Stimulation freigesetzt.

Der vWF kann den Blutgerinnungsfaktor VIII binden und bildet so den Faktor VIII-Komplex oder Faktor VIII:C/vWF-Komplex, welcher den Faktor VIII:C als stabilisiertes Protein enthält. Ein vWF-Mangel führt unweigerlich auch zu einer Reduktion der Faktor VIII:C-Konzentration im Blut, da der Stabilisierungseffekt des vWF ausbleibt. Der vWF schützt den Faktor VIII:C vor proteolytischem Abbau.

Der proteolytische Abbau von vWF ist ein physiologischer Prozeß in gesunden Personen kann aber in Patienten mit von Willebrand-Disease (vWD) vom Typ 2A erhöht sein, was dazu führt, daß bei diesen Patienten die vWF-Multimere mit den größten Molekülmassen fehlen.

Ein kleiner Teil des vWF im normalen Plasma liegt als 189-, 176- und 140- kD-Fragmente vor, welche aus dem proteolytischen Abbau von vWF in vivo entstanden sind, wobei das 140 kD-Fragment von der N-terminalen Region und das 176 kD-Fragment von der C-terminalen Region der Untereinheit stammt. LMW-Formen von vWF wurden aus normalem menschlichen Plasma isoliert und nach Disulfid-Reduktion einer SDS-PAGE unterzogen. Der unüblich hohe Anteil von vWF-Fragmenten ist konsistent mit der Ansicht, daß die LMW-Formen des vWF teilweise oder größtenteils von großen Multimeren durch proteolytischen Abbau entstanden sind.

Die Infusion von 1-Desamino-8-D-arginin-Vasopressin in gesunden Personen führte zum Auftreten von Multimeren mit großen Molekülmassen im Plasma, welche im Anschluß sehr schnell wieder durch proteolytischen Abbau degradiert wurden. Bei erworbener vW-Krankheit (vWD), die mit dem myeloproliferativen Syndrom assoziiert ist, wurde ebenfalls ein Fehlen von großen vWF-Multimeren und ein erhöhter Level von proteolytischen Fragmenten beobachtet, was ebenfalls auf eine erhöhte Proteolyse in vivo hindeutet. Ungewohnt große molekulare Formen von vWF wurden in Patienten mit thrombotischer thrombocytopenischer Purpura (TTP) gefunden; diese großen Multimere verschwanden nach Transfusion mit normalem frisch gefrorenem Plasma. Es war zwar evident, daß ein oder mehrere proteolytische Enzyme in die physiologische Regulierung der polymeren Größe von vWF im zirkulierenden Blut involviert sind und daß diese auch eine wichtige Rolle bei der Pathogenese von vWF-Abnormalitäten in einigen Patienten mit vererbten oder erworbenen Störungen der Haemostase spielen; das für die vWF-Proteolyse im normalen menschlichen Plasma zuständige proteolytische Enzym wurde bisher aber noch nicht identifiziert.

Es wurde zwar von mehreren Proteasen gezeigt, daß sie in der Lage sind, vWF derart zu spalten, daß dessen Bindungsaffinität für Blutplättchen verlorengeht; jedoch ergab die Behandlung von vWF mit diesen Proteasen jeweils andere Spaltungsprodukte als die aus der in vivo-Spaltung hervorgegangenen Fragmente.

So ist z.B. Plasmin in der Lage, einige Peptidbindungen im vWF zu spalten, jedoch bleibt eine hochmolekulare Kernregion mit rund 70 % der Blutplättchen-agglutinierenden Aktivität (bestimmt als Ristocetin-Cofaktor) erhalten. Ein 34 kD-Peptid wurde vom N-Terminus einzelner vWF-Untereinheiten in einer frühen Stufe bei der Behandlung mit Plasmin abgespalten. Epitop-Mapping von Plasmin-induzierten Fragmenten zeigte deutlich, daß diese Fragmente aus den Bereichen der vWF-Untereinheit entstanden sind, welche verschieden von denjenigen Fragmenten sind, die in zirkulierendem Plasma vorhanden sind.

Auch für pankreatische Elastase aus Schwein und verschiedene Serinproteasen aus menschlichen Leukozyten konnte gezeigt werden, daß sie in der Lage sind, vWF proteolytisch derart zu verdauen, daß die großen Multimere verlorengehen. Wiederum konnte durch Epitop-Mapping der Abbauprodukte gezeigt werden, daß auch diese Fragmente von denjenigen in Normalplasma und in vWD Typ 2A verschieden waren. Darüberhinaus zeigte sich, daß die vWF-Multimeren-Muster in Plasmaproben von Patienten mit extrem hohen oder niedrigen Neutrophil-Zählungen von denjenigen im normalen menschlichen Plasma nicht erheblich verschieden waren.

Neben den erwähnten Serinproteasen konnte auch für eine Calpainähnliche Protease aus menschlichen Blutplättchen gezeigt werden, daß sie in der Lage war, große vWF-Multimere abzubauen.

Weiters konnte durch Analyse der zirkulierenden vWF-Fragmente gezeigt werden, daß die Peptidbindung zwischen den Aminosäuren Tyr842 und Met843 in der vWF-Untereinheit von Patienten mit vWD vom

Typ 2A gespalten wird; eine Spaltstelle, die eine Calpainähnliche Spezifität indiziert. Demgegenüber konnte auch gezeigt werden, daß Calpaine aus Schweine-Erythrozyten oder aus Schweinenieren nicht die in vivo erzeugten vWF-Fragmente produzieren konnten.

Rekombinanter vWF (rvWF) kann in CHO-Zellen hergestellt werden, beispielsweise gemäß FEBS Letters 375, 259-262 (1995). Der auf diese Art gewonnene rvWF liegt als reifer vWF vor und weist eine Singulett-Struktur auf, d.h. er unterscheidet sich von dem plasmatischen vWF, welcher bei der Untersuchung in 2%-igen SDS-Agarosegelen stets in einer charakteristischen Satellitenstruktur vorliegt.

In der WO 96/10584 ist beschrieben, daß der rvWF aus Multimeren mit einer hohen strukturellen Integrität besteht, die auch nach dem Reinigen und Behandeln zur Inaktivierung von Viren noch erhalten bleibt. Die intakte Struktur des rvWF ist definiert durch das Ergebnis der elektrophoretischen Analyse von Multimerenbanden in Abwesenheit von Satellitenbanden.

Da die mit gegenüber der natürlichen Aktivität veränderten vWF-Abbauaktivitäten behafteten bzw. aufgrund eines erhöhten vWF-Gehalts pathologischen Zustände, welche häufig zu Thrombosen oder thromboembolischen Krankheitszuständen führen, durch eine körpereigene vWF-spaltende Enzymaktivität zu korrigieren sein müßten, liegt der vorliegenden Erfindung die Aufgabe zugrunde, eine pharmazeutische Zusammensetzung zur Verfügung zu stellen, welche eine den vWF physiologisch spaltende Enzymaktivität umfaßt, um derartige Zustände zu korrigieren.

Erfindungsgemäß gelöst wird diese Aufgabe durch eine pharmazeutische Zusammensetzung enthaltend eine gemäß der vorliegenden Beschreibung gereinigte Enzymaktivität, welche aufgrund ihrer proteolytischen Aktivität gegenüber von Willebrand-Faktor-Multimeren mit als "Multimerase" bezeichnet wird, und die folgenden Eigenschaften aufweist:

- a) sie besitzt eine mittelbare bzw. unmittelbare proteolytische Aktivität und setzt vWF mit einer Singulettstruktur zu vWF mit einer Satellitenstruktur um,
- b) sie ist aktiv in Gegenwart des Serinprotease-Inhibitors Diisopropylfluorophosphat (DFP) oder des Calpain-Protease-Inhibitors Z-Leu-Leu-Tyr-CHN₂, und
- c) sie ist zur Inaktivierung bzw. Abreicherung von Viren behandelt.

Eigenschaft a) kann mittels eines einfachen Tests durch Behandeln eines rekombinanten vWF mit Singulettstruktur mit der Multimerase bestimmt werden, (welcher in den Beispielen näher erläutert ist, und stellt eine für Proteasen völlig neue Eigenschaft dar, welche bislang einzigartig für die erfindungsgemäße Multimerase ist.

Die Satellitenstruktur, beispielsweise die Tripletstruktur, entspricht dem Bild der Multimeren nach elektrophoretischer Analyse von plasmatischem vWF, welches durch jeweils eine zentrale Bande und mehrere Satellitenbanden gekennzeichnet ist (vgl. Fig. 12 und 13).

Das Inkubieren der Multimerase mit dem biologisch aktiven vWF wird vorzugsweise in Gegenwart eines Serinprotease-Inhibitors durchgeführt, da durch die Inkubation in Gegenwart eines Serinprotease-Inhibitors unspezifische, nicht unmittelbar auf die Multimerase zurückführende proteolytische Prozesse, welche durch die im Blut bzw. im Plasma vorhandenen Serinproteasen bedingt sind, vermieden werden können.

"Mittelbar" bzw. "unmittelbar" soll indizieren, daß die erfindungsgemäße Multimerase eine direkte, ohne Aktivator mediierte, proteolytische Aktivität aufweist bzw. über einen entsprechenden Aktivierungseffekt oder einen Vermittler zu einer verstärkten proteolytischen Aktivität beiträgt.

Die Multimerase weist vorzugsweise eine optimale proteolytische Aktivität bei einem pH im Bereich von 7 bis 10, vorzugsweise pH 7,5 bis 8,5, auf. Dieser optimale pH-Bereich hängt jedoch stark von dem (Ionen-) Milieu ab, in dem die Reaktion durchgeführt wird.

Bevorzugterweise wird die Multimerase in einer Fraktion zur Verfügung gestellt, die nach Gelfiltration einer Plasma- oder Serumfraktion entsprechend dem Molekulargewicht von mehr als 200 kD, vorzugsweise im Bereich von etwa 300 kD, erhalten wird.

Bevorzugterweise ist die Multimerase nach erfindungsgemäßer Aufreinigung gegenüber Plasma in mindestens 1000-fach, vorzugsweise in mindestens 10 000-fach, angereicherter Form im pharmazeutischen Präparat vorhanden.

Vorzugsweise weist die gereinigte Multimerase in der pharmazeutischen Zusammensetzung eine spezifische Aktivität von mindestens 10 E/mg Protein in Gegenwart eines Serinprotease-Inhibitors auf. Eine Einheit ist als jene Enzymaktivität definiert, die in einem Milliliter humanem Normalplasma enthalten ist bzw. generiert werden kann.

Es hat sich gezeigt, daß die Multimerase in Gegenwart von bzw. nach Inkubation mit zweiwertigen Metallionen, wie Erdalkali-Ionen, insbesondere Ba²⁺, Sr²⁺, Ca²⁺ und Mg²⁺, besonders aktiv ist und deren Aktivität durch Scherkräfte, reduzierte Ionenstärke oder chaotrope Mittel weiter erhöht werden kann.

Die Aktivität der Multimerase wird vor allem dann generiert, wenn die Ionenstärke des Milieus auf unter die physiologische Ionenstärke herabgesetzt wird, insbesondere entsprechend einer Konzentration von

weniger als 15 mM Tris. Die Scherkräfte, welche beim Durchströmen einer Kapillaren, beim Rühren in Behältern oder beim Durchtritt durch eine Düse oder generell durch mechanische Beanspruchung der Multimerase bzw. deren Substrat wirken können, wesentlich zur erhöhten Aktivität der Multimerase beitragen. Die Wirkung der chaotropen Stoffe ist vermutlich auf die teilweise oder vollständige Veränderung der Tertiärstruktur eines Proteins zurückzuführen. Zu diesen Stoffen zählen Salze, wie Ammoniumsulfat, Calciumchlorid, Thiocyanate, aber auch Harnstoff und Guanidiniumchlorid.

Vorzugsweise weist die Multimerase im erfindungsgemäßen pharmazeutischen Präparat eine verstärkte Aktivität gegenüber modifiziertem vWF, wie partiell denaturiertem vWF oder vWF mit einer Konformationsänderung, auf.

Die erfindungsgemäße Multimerase kann durch das Unterlassen oder Stoppen der Aktivierung inhibiert werden. Als Inhibitor können daher Chelatbildner, wie EDTA, EGTA und Citrat eingesetzt werden, die auf das Metalloenzym inhibierend wirken. Die Aktivität der Multimerase kann aber auch durch vWF-Peptide entsprechend der Tyr842-Met843-Peptidsequenz inhibiert werden, welche die Bindungsstelle der Multimerase blockieren können. Ein Herabsetzen der Temperatur, beispielsweise durch Einfrieren der Multimerase enthaltenden Fraktion, führt ebenfalls zur Reduktion der Multimerase-Aktivität.

Die Inaktivierung bzw. Abreicherungsbehandlung von Viren wird vorzugsweise durch Behandlung der Multimerasepräparation mit Tensiden und/oder Hitze gewährleistet, beispielsweise durch eine Hitzebehandlung in festem Zustand, insbesondere eine Dampfbehandlung gemäß der EP-0 159 311, oder der EP-0 519 901 oder der EP-0 674 531.

Weitere Behandlungen zur Inaktivierung von Viren umfassen auch die Behandlung mit chemischen oder chemisch/physikalischen Methoden, z.B. mit chaotropen Stoffen gemäß der W094/13329, DE 44 34 538 oder EP-0 131 740 (Lösungsmittel) oder die Photoinaktivierung.

Die Nanofiltration stellt ebenfalls ein bevorzugtes Verfahren zur Abreicherung von Viren im Rahmen der vorliegenden Erfindung dar.

Gemäß einem weiteren Aspekt betrifft die vorliegende Erfindung die erfindungsgemäße Multimerase als Arzneimittel, insbesondere die Verwendung der erfindungsgemäßen Multimerase zur Herstellung einer Präparation zur Prophylaxe und Therapie von Thrombosen oder thromboembolischen Krankheitszuständen, bevorzugterweise zur Prophylaxe und Therapie von einem supranormalen vWF-Gehalt oder erhöhten Anteil von hochmolekularem vWF.

Der supranormale vWF-Gehalt kann dabei auf eine supranormale vWF-Antigenkonzentration oder eine supranormale vWF-Aktivität zurückzuführen sein, wobei unter Aktivität insbesondere die primäre haemostatische Aktivität, aber auch die Bindungsaktivität an das Subendothel, an die Thrombozyten, an den Thrombozytenadhäsionsproteinen, wie GPIb- und GPIIb/IIIa-Komplex, an Collagen, Faktor VIII und Heparin, gemeint ist.

Bevorzugterweise betrifft die erfindungsgemäße Verwendung die Herstellung einer Präparation zur Prophylaxe und Therapie von thrombotischer thrombozytopenischer Purpura, Henoch-Schönlein-Purpura, haemolytisch-urämischem Syndrom sowie von Praeklampsie oder neonataler Thrombozytopenie.

Die thrombotische thrombozytopenische Purpura (TTP) wurde erstmals beschrieben durch Moschcowitz 1924 und ist gekennzeichnet durch Thrombozytopenie mit normaler Megakaryozytenzahl im Knochenmark, mikrovaskulären Thrombosen, hyalinen Thromben, einer eingeschränkten Nierenfunktion und Endothelzellproliferation. Die pathologischen und klinischen Ergebnisse bei Patienten mit TTP weisen auf einen direkten thrombozytenaggregierenden Stimulus in der Mikrozirkulation hin.

Das klinische Bild wird neben der Thrombozytopenie durch intravaskuläre Hämolyse mit fragmentierten Erythrozyten und neurologischen Symptomen ergänzt. Die geschätzte Inzidenz der Normalbevölkerung liegt bei 0,1/100.000/Jahr. Bei HIV-Infizierten liegt sie bei etwa 4/100.000. Es scheinen verschiedene Typen von TTP zu existieren. Neben einer primären TTP kommen auch sogenannte sekundäre TTP's in Zusammenhang mit Schwangerschaft, Chemotherapie, Knochenmarktransplantation und Autoimmunerkrankungen vor. Bei der Chronic Relapsing TTP (CRTTP) gibt es häufige Episoden in regelmäßigen Intervallen. Im Plasma der Patienten mit TTP finden sich ungewöhnlich hohe multimere Formen des vWF's, die von den Endothelzellen freigesetzt werden. Diese ungewöhnlich großen vW-Multimeren binden sich unter "shear stress" Glykoprotein Ib und Glykoprotein IIb/IIIa viel stärker als normaler vWF und bewirken die intravaskuläre Thrombozytenaggregation.

Die Attacken der TTP können nur schwierig behandelt werden. Meistens versucht man durch Plasmaaustausch die hoch-molekularen vWF-Multimeren zu entfernen.

Henoch-Schönlein Purpura (HSP) ist ein klinisches Syndrom, das charakterisiert wird durch nicht-thrombozytopenische Purpura, Arthralgien und Glomerulonephritis. Patienten mit HSP haben ein abnormales vWF-Multimeren-Bild mit supranormalen hochmolekularen vW-Multimeren. Der Nachweis dieser supranormalen vW-Multimeren in HSP weist auf eine Störung der Endothelzellfunktion hin. Die Multimeren mit

kleinem Molekulargewicht werden im sogenannten konstitutiven Mechanismus von den Endothelzellen abgegeben, während die Multimeren von hohem Molekulargewicht aus den "Weibel/Palade bodies" der Endothelzellen nach Stimulation freigesetzt werden.

Die erfindungsgemäße pharmazeutische Präparation wird hergestellt, indem ein Multimerase-haltiges Ausgangsmaterial vorzugsweise durch chromatographische Methoden, wie Ionenaustauschchromatographie, hydrophobe Chromatographie oder Affinitätschromatographie, aufgereinigt wird und anschließend nach bekannten Methoden fertiggestellt wird, indem es gegebenenfalls mit geeigneten Puffer-, Hilfs-, Konservierungs-, und/oder Stabilisierungssubstanzen bzw. Proteaseinhibitoren vereinigt wird und in einer zur Verabreichung geeigneten Form abgefüllt und vorzugsweise lagerstabil, gegebenenfalls in lyophilisiertem oder gefrorenem Zustand, verpackt wird.

Die effektive Dosierung des Präparates bei der Anwendung richtet sich sehr individuell nach dem jeweiligen Krankheitsbild und sollte vorzugsweise nach Bestimmung der körpereigenen vWF-Protease-Aktivität im Patienten (beispielsweise mit dem erfindungsgemäßen Bestimmungsverfahren (siehe unten)) gewählt werden. Die Dosierung richtet sich auch danach, ob die parenterale, vorzugsweise intravenöse, subkutane oder intramuskuläre Verabreichung in Bolusform, systemisch und/oder lokal am Ort der Thrombose erfolgen soll oder nicht.

Im Rahmen der Verabreichung des erfindungsgemäßen Präparates sollten ständig die vWF-Plasmakonzentration, sowie die Struktur des vWF und die vWF-Protease-Aktivität im Patienten überwacht werden und aufgrund dieser Ergebnisse die Dosierung optimiert werden.

Die erfindungsgemäße Präparation kann dabei sowohl durch Aufreinigung aus Blut, Serum oder Plasma als auch durch ein entsprechendes Expressionssystem hergestellt werden.

Eine erfindungsgemäße Präparation kann auch durch die Expression der Multimerase in vivo oder ex vivo zur Verfügung gestellt werden. Dazu eignen sich vor allem Säugetierzellen, insbesondere humane Zellen, die kultiviert und gegebenenfalls in den Patienten eingebracht werden können. Im Rahmen einer Gentherapie ist es möglich, die für die Multimerase kodierende Nukleinsäure in Zellen einzuschleusen, insbesondere in arterielle Endothelzellen, die in Gefäßen bzw. Gefäßprothesen die Multimerase exprimieren können.

Für diese Technologie kann eine Nukleinsäure kodierend für die Multimerase auf bekannte Art zur Verfügung gestellt werden. Voraussetzung dafür ist eine gereinigte Multimerase, die als Vorbild für die Nukleinsäure herangezogen wird. Diese Nukleinsäure kann entweder über einen Vektor oder direkt in die Wirtszelle eingebracht werden, wo die Expression der Multimerase auf bekannte Art vorgenommen wird.

Gemäß einem weiteren Aspekt betrifft die vorliegende Erfindung ein Verfahren zur Bestimmung der proteolytischen Aktivität der erfindungsgemäßen Multimerase.

Zum Nachweis der Multimerase-Aktivität dient ein Verfahren, welches die folgenden Schritte umfaßt: Inkubieren einer Fraktion enthaltend die Multimerase mit einem vWF und Bestimmen der Umsetzungsrate des vWF. Die Fraktion ist beispielsweise eine Plasmaprobe oder eine Plasmafraktion bzw. eine Fraktion mit der angereicherten, gegebenenfalls gereinigten Multimerase. Diese wird mit einem vWF in Kontakt gebracht, der ein nativer humaner vWF, vorzugsweise mit einer Singulettstruktur, sein kann oder ein entsprechendes vWF-Fragment enthaltend die Tyr842-Met843-Peptidsequenz.

Die Inkubation wird vorzugsweise unter Bedingungen durchgeführt, die eine optimale Aktivität der Multimerase, wie zuvor beschrieben, gewährleisten. Während der Inkubation, die vorzugsweise unter nahezu physiologischen Bedingungen vorgenommen wird, bei pH 7 bis 10, vorzugsweise pH 7,5 bis 8,5, 20 bis 40 °C, vorzugsweise etwa Raumtemperatur, wird der vWF umgesetzt, abgebaut bzw. inaktiviert und das Resultat der Reaktion bestimmbar. Detektiert werden beispielsweise vWF-Abbauprodukte und Fragmente, wie Multimere mit niederen Molekülmassen oder Satellitenbanden nach elektrophoretischer Analyse, oder die Veränderung der Aktivität des vWF.

Das Inkubieren der Multimerase mit dem biologisch aktiven vWF wird beim erfindungsgemäßen Verfahren vorzugsweise in Gegenwart eines Serinprotease-Inhibitors durchgeführt, und die Umsetzungsrate bevorzugt durch das Ausmaß der Inaktivierung oder der Bildung von bestimmten Fragmenten bzw. Satellitenbanden des vWF bestimmt.

Durch die Inkubation in Gegenwart eines Serinprotease-Inhibitors, wie Aprotinin, können unspezifische nicht unmittelbar auf die Multimerase zurückführende proteolytische Prozesse, welche durch die im Blut bzw. im Plasma vorhandenen Serinproteasen verursacht werden, vermieden werden.

Die Bestimmung der proteolytischen Aktivität des erfindungsgemäßen Multimers kann jedoch nicht nur durch direkte Umwandlung des vWF durchgeführt werden, sondern auch durch Spalten eines chromogenen Substrats, welches eine zur vWF-Peptidbindungssequenz Tyr842-Met 843 homologe Peptidsequenz sowie eine chromogene Gruppe aufweist, indem das Substrat unter Einwirkung der Multimerase gespalten und ein Chromophor gebildet wird, worauf die Farbentwicklung bestimmt wird, welche direkt proportional zur

proteolytischen Aktivität der Multimerase gesetzt werden kann.

Die Erfindung betrifft weiters auch vWF-Präparationen, die frei sind von einer Multimerase-Aktivität und insbesondere in Abwesenheit einer Multimerase-Aktivität hergestellt worden sind. Diese vWF-Präparationen enthalten vorzugsweise den nativen vWF, der das gesamte Spektrum der Multimeren enthält und sich durch einen geringen Grad der Spaltung der Tyr842-Met843-Peptidbindung auszeichnet. Jedoch können alternativ dazu auch eine vWF-Fraktion, rvWF, ein vWF-Derivat bzw. ein vWF-Fragment oder eine vWF-Mutante enthalten sein, vorausgesetzt, daß sie die Tyr842-Met843-Peptidsequenz enthalten. Diese Präparation eignet sich vor allem zur Herstellung von pharmazeutischen Präparationen, da sie aufgrund der mangelnden Multimerase-Aktivität auch nach längerer Lagerung, beispielsweise im flüssigen Zustand, unverändert bleiben.

Die erfindungsgemäße vWF-Präparationen können durch spezifische Inhibition der Multimerase zur Verfügung gestellt werden oder aber durch die Abtrennung bzw. Abreicherung der Multimerase mit den zuvor genannten chromatographischen Reinigungsverfahren, insbesondere durch die Immunaффinitätschromatographie unter Verwendung von Antikörpern, die gegen die Multimerase gerichtet sind. Die Inhibition kann durch einen Gehalt eines Chelatbildners im pharmazeutischen Präparat erreicht werden oder durch spezifische Inhibitoren, die sich gleich einem "Substratmimic" an das aktive Zentrum der Multimerase binden und damit die Aktivität in kompetitiver Weise hemmen.

Das pharmazeutische vWF-Präparat, welches eine reduzierte Multimerase-Aktivität, insbesondere von weniger als die Nachweisgrenze enthält, enthält vorzugsweise weiters den Blutgerinnungsfaktor VIII, ein Faktor VIII-Derivat oder eine Faktor VIII-Mutante, welcher durch die Komplexbindung an den vWF stabilisiert ist. Nachdem das Multimerenmuster im erfindungsgemäßen vWF-Präparat über einen längeren Zeitraum überraschenderweise unverändert bleibt, d.h. permanent ist, ist auch der Stabilisierungseffekt für den Faktor VIII im erfindungsgemäßen pharmazeutischen Präparat auch nach längerer Lagerung im flüssigen Zustand unverändert und permanent.

Das erfindungsgemäße pharmazeutische Präparat ist daher nicht nur im lyophilisierten oder flüssig-tiefgefrorenen Zustand lagerstabil, sondern auch als Flüssigpräparat.

Mit Hilfe der erfindungsgemäßen Multimerase können weiters resistente Formen des vWF definiert werden. Bestimmte vWF-Fraktionen, Derivate bzw. Mutanten werden dementsprechend mit einer Fraktion enthaltend eine definierte Multimeraseaktivität inkubiert und das Ausmaß des proteolytischen Abbaues bestimmt. Eine resistente Form des vWF liegt dann vor, wenn die Multimerase-Aktivität die vWF-Aktivität im wesentlichen nicht beeinflusst. Diese resistente Form des vWF kann zur Stabilisierung des FVIII:C in vitro und in vivo herangezogen werden. Damit wird nicht nur die Halbwertszeit der vWF-Form in vivo verlängert, sondern auch die Verweilzeit des FVIII:C in Plasma.

Schließlich betrifft die vorliegende Erfindung auch ein Verfahren zur Herstellung von Antikörpern gegen die erfindungsgemäße Multimerase, welches derart durchgeführt wird, daß eine Präparation enthaltend die angereicherte, gegebenenfalls gereinigte erfindungsgemäße Multimerase als Immunogen verwendet wird und entsprechende polyklonale oder monoklonale Antikörper gegen die Multimerase auf an sich bekannte Art und Weise hergestellt werden.

Ferner betrifft die vorliegende Erfindung auch eine Antikörper-Präparation, welche Antikörper gegen die Multimerase enthält, wobei die Antikörper-Präparation monoklonal oder polyklonal sein kann.

Bevorzugterweise werden die erfindungsgemäßen Antikörper an einer festen Phase immobilisiert und können so zum immunologischen Nachweis oder für die Reinigung der Multimerase verwendet werden.

Die vorliegende Erfindung wird an Hand der nachfolgenden Beispiele sowie den Zeichnungsfiguren, auf die sie jedoch nicht beschränkt sein soll, näher erläutert.

Es zeigen: Fig. 1: die vWF-Aufreinigung; Fig. 2: den Abbau von vWF durch kontaminierende Proteasen; Fig. 3: den Effekt von Salz und Harnstoff auf die vWF-Spaltung; Fig. 4: den Abbau von vWF durch verschiedene Blutkomponenten; Fig. 5: die Reinigung der Proteine aus Plasma; Fig. 6: die Chromatographie der Protease auf Sephacryl S-300 HR; Fig. 7: SDS-PAGE der nach der Sephacryl S-300 HR-Chromatographie erhaltenen Fraktionen; Fig. 8: den Einfluß von Metallionen und pH auf die Aktivität der vWF-spaltenden Protease; Fig. 9: die Wirkung von Proteaseinhibitoren auf den vWF-Abbau; Fig. 10: SDS-PAGE der vWF-Abbauprodukte; Fig. 11: die Wirkung der vWF-Protease auf Fibrinogen, BSA, Collagen aus Kälberhaut und verdünntes Normalplasma; Fig. 12: den Abbau von vWF mit der erfindungsgemäßen Multimerase; Fig. 13: den Abbau von vWF aus Kryopräzipitat mit der erfindungsgemäßen Multimerase; Fig. 14: den Abbau von vWF-Hochmultimeren und r-vWF mit der erfindungsgemäßen Multimerase; Fig. 15: den Abbau von r-vWF mit Plasmin; Fig. 16: den Abbau von r-vWF mit Plasmin mit und ohne Inhibitoren; Fig. 17: den Abbau von vWF aus Kryopräzipitat mit Plasmin; und Fig. 18: die Inkubation von r-vWF in vWF-defizientem, humanem Plasma.

Beispiele:**Reinigung von vWF**

5 vWF wurde durch Gelfiltration von menschlichem Kryopräzipitat aus 1 l Citratplasma auf einer 2,6 x 35 cm Sepharose CL-2B-Säule (Firma Pharmacia, Uppsala, Schweden) gereinigt. Die Elution wurde mit 0,13 M Natriumchlorid, 0,01 M Citrat, 0,01 M Tris-HCl, pH 7,4, vorgenommen. 6 ml-Fractionen wurden bei einer Durchflußgeschwindigkeit von 24 ml/h gesammelt. vWF-Antigen wurde durch ELISA bestimmt, wobei ein polyklonales Kaninchen-Antiserum gegen menschlichen vWF (RAHu/FVIII, Fa. Nordic (Tillburg, Niederlande)), Peroxidase-markierte Kaninchen-anti-Mensch-vWF-Antikörper, monoklonale Maus-Antikörper gegen Kaninchen-IgG (M737) und der Kit für die Immunofärbung (K670) (alle von der Fa. Dako (Glostrup, Dänemark)), gemäß den im Kit inkludierten Arbeitsvorschriften verwendet wurde.

Die Ergebnisse der vWF-Aufreinigung sind in Fig. 1 dargestellt: Dabei enthielten die Fraktionen 12 bis 20 vWF, welcher im wesentlichen frei von kontaminierenden Proteinen ist. Diese Fraktionen wurden als Substrat in der Bestimmung der vWF-Spaltungsaktivität (siehe unten) verwendet.

Es zeigte sich, daß der in diesen Fraktionen enthaltende vWF sehr stabil war; so wurde selbst nach 24-stündiger Dialyse-Inkubation bei 37 °C (in Abwesenheit von Inhibitoren) ein identes Multimeren-Muster wie mit den unbehandelten Fraktionen erhalten, und zwar sowohl bei der 24-stündigen Dialyse gegen 0,13 M Natriumchlorid, 0,01 M Citrat, 0,01 M Tris-HCl, pH 7,4, als auch bei der 24-stündigen Dialyse gegen 1 M Harnstoff, 5 mM Tris-HCl, pH 7,4. SDS-Agarosegele dieser Untersuchungen sind in Fig. 2 dargestellt.

Die nachfolgenden Fraktionen zeigten jedoch einen starken vWF-Abbau bei niedrigen Salzkonzentrationen in Anwesenheit von Harnstoff.

Effekt der Salz- und Harnstoffkonzentrationen auf die Spaltung von vWF:

25 Aliquots der Fraktion Nr. 29 aus der Sepharose CL-2B-Säule wurden gegen eine 5 mM Tris-HCl (pH 7,4)-Lösung, welche unterschiedliche Salzkonzentrationen aufwies, in An- oder Abwesenheit von Harnstoff dialysiert, wobei keine Calciumionen zugegeben wurden. Parallele Untersuchungen wurden mit weiteren Aliquots der Fraktion 29 durchgeführt, welche vor der Dialyse einer 5-minütigen Inkubation mit 30 1 mM DFP unterzogen wurden. Aus Fig. 3 kann ersehen werden, daß die großen vWF-Multimere nach der Dialyse verschwanden, wenn kein Natriumchlorid vorhanden war. Weiters konnte der vWF-Abbau durch 1 M Harnstoff selbst bei physiologischen Salzkonzentrationen deutlich gesteigert werden. Die Kombination von niedriger Salzkonzentration mit 1 M Harnstoff führte zum vollständigen Abbau von vWF. Eine Vorinkubation mit 1 mM DFP, eines starken Serinprotease-Inhibitors, brachte identische Resultate. Für einen empfindlichen Test zur Bestimmung der Proteaseaktivität wurde daher die Dialyse bei 37 °C gegen 1 M Harnstoff, 5 35 mM Tris-HCl als optimale Bedingungen gewählt.

Bestimmen der vWF-Spaltungsaktivität

40 Da der Abbau von vWF - wie erwähnt - sehr stark von den angewendeten Pufferbedingungen abhängig ist, wurden Enzym und Substrat an einer zirkulären Dialysemembran (Millipore VSWP; Durchmesser 25 mm; Firma Milipore (Beford, USA)) inkubiert, wobei die Oberfläche mit 50 ml Dialysepuffer inkubiert wurde. Das für das vorliegende Testsystem ausreichend optimierte Puffersystem umfaßte daher eine Dialyselösung mit 1 M Harnstoff in 5 mM Tris-HCl bei pH 8. Die volle Aktivierung der Protease wurde durch 5-minütige 45 Vorinkubation bei 35 °C in 10 mM Bariumchlorid erreicht. In einem typischen Experiment wurden 50 µl aktivierter Proteaselösung und 100 µl Substratlösung vorsichtig auf eine Floating-Membran aufgebracht und in einem geschlossenen Röhrchen für 24 h in einem trockenen Ofen bei 37 °C inkubiert.

Proteasefreie Fraktionen von vWF von der Sepharose CL-2B-Säule wurden als Substratlösung verwendet, wobei die vWF-Konzentration in der Inkubationsmischung bei ungefähr 30 µg/ml lag. Die Reaktionsmischungen wurden dann anschließend von der Oberfläche der Membranfilter entfernt und einer SDS-Agarosegel-Elektrophorese unterzogen, um das Multimerenmuster von vWF zu untersuchen.

SDS-Agarosegel-Elektrophorese und Immunoblotting von un- duziertem vWF:

55 Dünnschichtagarose-Elektrophorese wurde unter Verwendung des diskontinuierlichen Puffersystems wie es von Ruggeri und Zimmermann beschrieben worden ist (Blood 57 (1981), 1140) durchgeführt. Vor der Elektrophorese wurde jede Probe mit einem gleichen Volumen des SDS-enthaltenden Probenpuffers während 15 min bei 60 °C inkubiert. Die horizontale Elektrophorese selbst wurde in 1 %iger HGT(P)-

Agarose (2 mm dick, 20 cm breit und 8,5 cm lang) für 17 h bei 16 °C in einem LKB-Multiphor-Apparat (Pharmacia-LKB) bei 80 V und 10 mA durchgeführt. Die Proteine wurden während 3 h bei 26 V und 1,4 A auf eine Nitrocellulosemembran (Firma Schleicher & Schuell (Dassel, Deutschland)) elektrotransferiert, wobei eine Trans-Blot-Zelle mit einem Puffer enthaltend 0,04 % SDS und 0,05 M Phosphat, pH 7,4, verwendet wurde. vWF-Multimere wurden mittels Peroxidase-konjugierter Antikörper gegen menschlichen vWF identifiziert (mittels Peroxidase-markiertem Kaninchen-anti-Human-vWF-Antikörper P226 der Firma Dako (Glostrup, Dänemark)).

SDS-PAGE:

5 %ige SDS-Polyacrylamidgele wurden nach Laemmli (Nature 227 (1970), 680) bereitet. Die Proteine wurden mittels 65 mM DTT während 15 min bei 60 °C reduziert. Nichtreduzierte und reduzierte chromatographische Fraktionen von der Sephacryl S-300 HR-Säule wurden in 3 mm dicken Gelen für 18 h bei 60 V elektrophoretisch getrennt und mit Coomassie-Blau angefärbt.

Immunoblotting des reduzierten vWF:

Reduzierte Proben von ungeschnittenem und proteolytisch geschnittenem vWF wurden einer SDS-PAGE unterzogen und auf Nitrocellulose wie oben beschrieben elektrotransferiert. Zur Detektion der vWF-Fragmente wurde die Nitrocellulose mit einem Kaninchen-Antiserum gegen menschlichen vWF (RAHu/FVIII) inkubiert und anschließend mit Maus-Antikörpern gegen Kaninchen-IgG (M737; Fa. Dako (Glostrup, Dänemark)) und den APAAP (alkaline phosphatase anti-alkaline phosphatase)-Reagens (K670 der Fa. Dako (Glostrup, Dänemark)) gemäß Furlan et al. (PNAS 90 (1993), 7503) inkubiert.

Herstellung von Blutkomponenten, welche auf die Anwesenheit der Protease untersucht werden:

Vollblut wurde von normalen Personen in ein Glasröhrchen ohne den Zusatz von Antikoagulantien gewonnen. Nach 15 min bei Raumtemperatur wurde die geronnene Blutprobe zweimal für 15 min bei 2500 g zentrifugiert. Anschließend wurden 10 µl 10 mM PPACK (Diphenylalanin-propyl-arginin-chloromethylketon; Fa. Bachem, Bubendorf (Schweiz)) zu 10 ml Serum gegeben, 10 min bei Raumtemperatur inkubiert und bei -20 °C gefroren. Von derselben Person wurden 90 ml Blut in 10 ml 0,13 M Natriumcitrat in einer Plastikflasche gewonnen. Nach Zentrifugation für 15 min bei 300 g wurden ungefähr 50 ml Plättchenangereichertes Plasma (platelet rich plasma; PRP) gewonnen. Ein Aliquot von PRP wurde für 15 min bei 2500 g zentrifugiert. Das daraus resultierende Plättchen-arme Plasma (platelet-poor plasma; PPP) wurde nochmals für 15 min 3000 g rezentrifugiert und bei -20 °C gefroren. Das Plättchensediment wurde in 0,9 % Natriumchlorid in 1/15 des ursprünglichen Volumens wieder aufgenommen und dreimal gefroren und wieder aufgetaut. Die lysierten Plättchen wurden für 15 min bei 3000 g zentrifugiert und der entstandene Überstand und das Sediment bei -20 °C gefroren. Ein gefrorenes Aliquot des PPP wurde langsam aufgetaut, um Kryopräzipitat zu erhalten. Nach 15 minütiger Zentrifugation bei -5 °C und 3000 g wurden der Überstand und das Kryopräzipitat, welches in 1/15 des ursprünglichen Volumens in 0,9 %igem Natriumchlorid aufgenommen worden war, bei -20 °C gefroren. Ein weiteres Aliquot von PPP wurde in ein Glasröhrchen transferiert, mit 1/40 Volumen einer 1 M Calciumchloridlösung gemischt und für 15 min bei 37 °C inkubiert. Nach Entfernung des Fibringerinnsels und einer 15 minütigen Zentrifugation bei 3000 g wurde PPACK zu einer Endkonzentration von 25 µM zugegeben und das defibrinierte Plasma bei -20 °C gefroren. Die gefrorenen Proben wurden vor dem Test zur Bestimmung der Proteaseaktivität jeweils für 10 min bei 37 °C inkubiert.

Untersuchung von den hergestellten Blutkomponenten auf Protease-Aktivität

10 µl 10 mM PPACK und 10 µl 0,55 M Calciumchlorid wurden jeweils 200 µl Serum, PPP, Kryopräzipitat-freiem PPP, defibriniertem PPP sowie 15-fach konzentriertem Kryopräzipitat und lysierten Plättchen zugegeben. Nach 10-minütiger Inkubation bei 37 °C wurden 10 µl-Aliquots mit 40 µl vWF-Lösung gemischt, über Nacht bei 37 °C gegen 1 M Harnstoff, 5 mM Tris-HCl (pH 7,4) dialysiert und der proteolytische Abbau von vWF durch SDS-Agarose-Gelelektrophorese nachgewiesen.

Es stellte sich heraus, daß die Proteaseaktivität in PPP deutlich höher war als im Überstand oder im Sediment von lysierten Plättchen, welche durch 15-fache Ankonzentrierung von PRP erhalten worden waren (siehe Fig. 4). Die Proteaseaktivität konnte durch Defibrinierung nicht beeinträchtigt werden und wurde teilweise auch im Kryopräzipitat von PPP erhalten; das Kryopräzipitat, welches dem 15-fach konzentrierten

PPP entsprach, enthielt eine erhebliche Aktivität, wohingegen das nicht-konzentrierte Kryopräzipitat deutlich weniger Protease als die entsprechende Menge an PPP enthielt. Es konnte kein prinzipieller Unterschied in der Proteaseaktivität aus Citrat-PPP und in Serum aus nichtkoaguliertem Blut festgestellt werden.

5 Reinigung der Protease aus Plasma:

Fibrinogen wurde vor den chromatographischen Verfahrensschritten vom Plasma entfernt, da diese Reinigungsschritte möglicherweise geeignet sind, die Aktivierung der Gerinnungskaskade zu induzieren. Versuche zeigten auch, daß die Aktivität der vWF-abbauenden Protease nicht oder nicht wesentlich durch Defibrination des Plasmas oder der Plasmafraktion, DFP oder PPACK beeinflusst wurde.

450 ml Blut von gesunden Personen wurde in 63 ml Citrat/Phosphat/Dextrose/Adenin (CPD-A₁)-Lösung auf einer Waage gesammelt. Nach zwei Zentrifugationen für 15 min bei 20 °C und 2500 g wurde 1 M Calciumchlorid zu einer Endkonzentration von 25 mM zugegeben und das recalcifizierte PPP wurde für 30 min bei 37 °C gerührt. Nach Entfernung des Fibrinclots durch Zentrifugation wurden PPACK und DFP auf Endkonzentrationen von 5 µM bzw. 2 µM dem erhaltenen Serum zugegeben und für 15 min bei 37 °C inkubiert, um aktivierte Gerinnungsenzyme zu inhibieren. Weiters wurde das Serum gegen einen Äquilibriumspuffer mit 1 M Natriumchlorid und 0,05 M Tris-HCl bei pH 7,4 dialysiert. 50 ml Aliquots wurden bei -20 °C bis zur Reinigung gelagert.

Die Protease konnte aus dem defibrinierten Normalplasma als Ausgangsmaterial zunächst auf Cu²⁺-geladener chelatierender Sepharose (1,6 x 22 cm; Fa. Pharmacia LKB) unter Verwendung von schrittweiser Elution mit Äquilibriumspuffer mit steigender Glycinkonzentration gereinigt werden. Protease enthaltende Fraktionen (siehe waagrechter Strich in Fig. 5A) wurden gepoolt (dieser Pool enthielt 14,7 % des ursprünglichen Proteins), gegen 0,6 M (NH₄)₂SO₄/0,02 M Tris-HCl, pH 7,0, dialysiert und auf Butylsepharose (1,6 x 27 cm; Firma Pharmacia LKB) aufgebracht, wobei die meisten verunreinigenden Proteine durch schrittweise Elution bei niedriger (NH₄)₂SO₄-Konzentration entfernt werden konnten. Proteolytisch aktive Fraktionen (siehe Querstrich in Fig. 5B) von zwei Butylsepharose-Säulen wurden gepoolt (dieser Pool enthielt nahezu die gesamte Proteaseaktivität, jedoch nur 0,75 % des ursprünglichen Proteins), gegen ein 1 mM EDTA dialysiert, lyophilisiert, in 5 ml destilliertem Wasser aufgenommen und auf eine Sephacryl S-300 HR-Säule (2,6 x 90 cm; Firma Pharmacia LKB), welche mit 0,15 M NaCl, 0,01 M Tris-HCl, pH 7,4, äquilibriert worden ist, aufgebracht (siehe Fig. 5C; die Fraktionen unter dem Querschnitt enthielten die gesamte Proteaseaktivität, jedoch nur 0,08 % des ursprünglichen Gesamtproteins).

Um die Auflösung der Gelfiltration zu verbessern, wurde eine lange Säule durch Schließen des ersten Elutionszyklus simuliert, indem die eluierten Proteine in dieselbe Säule zurückgeführt und in einem zweiten Zyklus gesammelt wurden. Wiederum wurden die aktiven Fraktionen gepoolt, gegen 1 mM EDTA dialysiert, lyophilisiert und in 3 ml destilliertem Wasser wieder aufgelöst und einer weiteren Gelfiltration auf einer Sephacryl S-300 HR-Säule unterzogen.

Bei dieser Gelfiltration wurden die ersten zwei Zyklen geschlossen und die Fraktionen beim dritten Zyklus gesammelt. In all diesen geschilderten chromatographischen Verfahren wurden 6 ml-Fraktionen bei einer Flußrate von 60 ml/h gesammelt. Die Protease enthaltenden Fraktionen wurden bei -20 °C gelagert.

Die Ergebnisse sind in Fig. 6 dargestellt und zeigen die Elution des UV-absorbierenden Materials (Fig. 6A) und der Proteaseaktivität (Fig. 6B). Der Peak der Proteaseaktivität (Fraktionen 9 bis 17) enthielt nur 0,009 % des ursprünglichen Serumproteins. Daher wurde ein Reinigungsfaktor von ungefähr 10 000 erreicht. Dennoch enthielt die erhaltene Proteasepräparation noch wesentliche Mengen an kontaminierenden Proteinen (siehe Fig. 7). Der Peak der der Proteaseaktivität (Fraktionen 11 bis 15) trat zusammen mit einer Proteinbande im unreduzierten Gel mit einem Molekulargewicht von rund 300 kD auf, welche mit mehreren Proteinen mit einem Molekulargewicht im Bereich zwischen 130 und 450 kD auftrat (Hauptbanden mit M_r von 450, 200, 180 und 130 kD).

Aminosäurezusammensetzung und Sequenzanalyse:

Zur Analyse der Aminosäurezusammensetzung und der Aminosäuresequenz wurde die unreduzierte Peak-Fraktion der Protease und die reduzierten vWF-Fragmente gegen 1 mM EDTA dialysiert, lyophilisiert und in 1/50 des ursprünglichen Volumens vor der SDS-PAGE wieder aufgelöst. Die HMW-Proteinbanden wurden vom Gel auf eine PVDF (Polyvinylidendifluorid)-Membran (BioRad) während 6 h bei 26 V und 0,4 A elektrotransferiert, wobei 0,05 % SDS, 10 % Methanol, 0,05 M Borsäure, pH 9,0, als Transferpuffer verwendet wurden. Nach dem Transfer wurde die Membran mit Coomassie-Blau in 40 % Methanol gefärbt, mit 40 % Methanol und 10 % Eisessig entfärbt und luftgetrocknet. Die ausgeschnittenen Banden wurden auf das Blot-Cartridge des Applied Biosystems Model 477A-Sequenzators transferiert, der mit einer Online-

HPLC ausgestattet war, um die Phenylthiohydantoinderivate zu analysieren. Zur Analyse der Aminosäurezusammensetzungen wurden die Proteinbanden in der Gasphase über 6 N HCl für 22 h bei 110°C hydrolysiert. Die Aminosäuren wurden von der PVDF-Membran mit 70 % 0,1 N HCl/30 % Methanol extrahiert und durch HPLC als Phenylthiocarbamylderivate bestimmt. Die Aminosäurezusammensetzung der nicht-reduzierten Proteinbande, welche aus der Sephacryl S-300 HR-Säule zusammen mit der Proteaseaktivität eluiert wurde, ist in Tabelle 1 angeführt:

Tabelle 1

Aminosäure	Reste pro 1000 Reste
Asp + Asn	99,4
Thr	59,4
Ser	63,3
Glu + Gln	150,2
Pro	65,5
Gly	75,9
Ala	86,5
Val	70,7
Ile	32,9
Leu	101,7
Tyr	30,6
Phe	41,7
His	22,4
Lys	41,6
Arg	49,3

Einfluß von Metallionen und pH auf die Aktivität der vWF-spaltenden Protease:

95 µl Aliquots der gereinigten Protease wurden für 15 min bei 37°C mit 5 µl 0,2 M Lösungen der folgenden Salze vorinkubiert: ZnCl₂, CuSO₄, Cd(CH₃COO)₂, CoSO₄, NiCl₂, MnCl₂, MgCl₂, CaCl₂, SrCl₂ und BaCl₂. Anschließend wurden 50 µl des gereinigten vWF jedem Aliquot zugegeben und die Inkubationsmischungen auf Floating-Membranfilter transferiert. Nach 24-stündiger Inkubation bei 37°C gegen 1 M Harnstoff, 5 mM Tris-HCl, pH 7,4, wurden die Proben von den Filtern entfernt und einer SDS-Agarose-Gelelektrophorese unterzogen.

Es zeigte sich, daß die Protease durch Zn²⁺, Cu²⁺, Cd²⁺, Co²⁺, Ni²⁺ oder Mn²⁺ nicht aktiviert werden konnte. Eine nur mäßige Aktivierung zeigte sich mit Mg²⁺; eine deutliche Aktivierung konnte jedoch mit Ca²⁺, Sr²⁺, und insbesondere mit Ba²⁺ erreicht werden (siehe Fig. 8A).

Eine längere Vorinkubation mit Calcium, Strontium und Barium führte zu einem Verlust an Proteaseaktivität, sogar bei physiologischen Salzkonzentrationen und in Abwesenheit von Harnstoff, was möglicherweise auf Selbstverdauungsprozesse der Protease zurückzuführen sein könnte. Bei Abwesenheit dieser Ionen hält sich die Protease recht stabil in Lösung, was eine mehrtägige chromatographische Aufreinigung des Enzyms bei Raumtemperatur ermöglichte.

pH-Optima der Protease nach Aktivierung durch Calcium und Barium wurden bestimmt, indem die Protease mit 10 mM Calciumchlorid oder 10 mM Bariumchlorid vorinkubiert wurde, und mit vWF während der Dialyse im Harnstoff Tris-HCl-Puffer inkubiert wurden, wobei mehrere Puffer mit pH-Werten im Bereich zwischen 6 und 11 verwendet wurden. Das Multimeren-Muster von vWF in den dialysierten Proben wurden mit SDS-Agarose-Elektrophorese analysiert.

Das pH-Optimum des vWF-Abbaus durch die Calcium-aktivierte Protease lag um 9 bis 10, wohingegen die höchste Aktivität der Barium-aktivierten Protease bei ungefähr pH 8 lag (siehe Fig. 8B).

Die Experimente zur Bestimmung der vWF-abbauenden Proteaseaktivität wurden daher stets bei pH 8 nach einer Inkubation mit 10 mM Bariumchlorid durchgeführt.

Der Effekt von Protease-Inhibitoren auf den vWF-Abbau:

Gereinigte Protease wurde für 5 min bei 37°C mit 10 mM Bariumchlorid reaktiviert und dann für 15 min bei 37°C mit den folgenden Protease-Inhibitoren inkubiert: EDTA (Endkonzentration 10 mM), EGTA (10

mM), Na₃-Citrat (10 mM), Iodacetamid (IAA, 10 mM), N-Ethylmaleimid (NEM; 10 mM), DFP (1 mM), Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF; 1 mM), N- α -p-Tosyl-L-lysin-chloromethylketon (TLCK; 1 mM), N- α -p-Tosyl-L-phenylalanin-chloromethylketon (TPCK (1 mM), Leupeptin (0,01 mM) und Aprotinin (0,01 mM).

Weiters wurden die folgenden Carbobenzyloxy-(Z)-peptidyl-diazomethylketon-Inhibitoren getestet (alle bei einer Endkonzentration von 0,1 mM während Vorinkubierung mit der Barium-aktivierten Protease): Z-Leu-Leu-Tyr-CHN₂, Z-Val-Val-Tyr-CHN₂, Z-Phe-Ala-CHN₂, Z-Phe(I)-Ala-CHN₂, Z-Tyr-Ala-CHN₂ und Z-Phe-Phe-CHN₂. Nach der Vorinkubation wurden 100 μ l Aliquots der Enzym-Inhibitormischungen 50 μ l gereinigter vWF-Lösung zugegeben und die Mischungen während 24 h bei 37 °C gegen 1 M Harnstoff, 5 mM TrisHCl, bei pH 7,4, dialysiert. Der Abbau von vWF wurde mittels SDS-Agarose-Elektrophorese und Immunoblotting getestet (siehe Fig. 9A).

Die chelatierenden Agentien EDTA und EGTA konnten die Bariumvorinkubierte Protease komplett inhibieren, wohingegen mit Citrat nur eine Teilinhibierung erreicht werden konnte. Eine 15-minütige Vorinkubation mit den Sulfhydrylzym-Inhibitoren IAA und NEM konnte die Protease nicht inhibieren. Weiters zeigte die erfindungsgemäße Protease keine Inhibierung durch die Serinprotease-Inhibitoren DFP, PMSF und Aprotinin oder durch die Serin/Sulfhydrylprotease-Inhibitoren TLCK, TPCK und Leupeptin.

In weiteren Experimenten, bei welchen dieselben Inhibitoren auch in der Dialyselösung vorhanden waren, wurden dieselben Ergebnisse erzielt, mit einer Ausnahme: mit NEM konnte eine teilweise Protease-Inhibierung erreicht werden.

Es scheint daher die Protease sehr langsam durch NEM inhibiert zu werden, jedoch nicht durch IAA.

Unter den Peptidyl-Diazomethylketon-Inhibitoren, welche getestet wurden, konnten nur Z-Phe-Phe-CHN₂ und Z-Val-Val-Tyr-CHN₂ den proteolytischen Abbau von vWF beeinträchtigen (siehe Fig. 9B).

Polypeptid-Untereinheiten des abgebauten vWF und anderen Proteinen:

Gereinigter vWF (50 μ l) wurde mit verschiedenen Verdünnungen der Protease (100 μ l), welche mit 10 mM Bariumchlorid für 5 min bei 37 °C vorinkubiert worden war, gemischt und die Mischungen während 24 h bei 37 °C gegen 1 M Harnstoff, 5 mM Tris-HCl, pH 8,0, dialysiert. Die resultierenden Verdauungen wurden einer SDS-PAGE unterzogen nachdem sie mit DTT reduziert worden waren. Immunodetektion der reduzierten vWF-Fragmente wurde unter Verwendung des APAAP-Kits durchgeführt.

Der Abbau der intakten vWF-Untereinheit wurde begleitet durch das Auftreten von steigenden Mengen von zwei Fragmenten mit einem Molekulargewicht von 170 und 140 kD, wie durch Immunoblots von reduzierter SDS-PAGE gezeigt werden konnte (siehe Fig. 10).

In parallelen Experimenten wurden drei andere Proteine mit der gereinigten Protease inkubiert, nämlich jeweils 50 μ l-Lösungen von menschlichem Fibrinogen (0,4 mg/ml), BSA (0,2 mg/ml) oder Collagen aus Kalbshaut (0,4 mg/ml), welche mit jeweils 100 μ l der unverdünnten Protease, welche mit Bariumionen vorinkubiert wurden, inkubiert, wobei die Inkubationsmischungen für 24 h bei 37 °C gegen 1 M Harnstoff, 5 mM Tris-HCl, bei pH 8,0 dialysiert worden sind. Weiters wurde citriertes menschliches Normalplasma (Verdünnung 1 : 100) zusammen mit der erfindungsgemäßen Protease-Präparation dialysiert. In Kontrollexperimenten wurde die Protease durch 0,15 M Natriumchlorid/0,01 M Tris-HCl, pH 7,4, ersetzt. Nach der Dialyse wurden die Proteine mit DTT reduziert und auf eine SDS-PAGE aufgebracht. Coomassie-Blau-Färbung wurde zur Detektion der Polypeptidketten verwendet.

Es zeigte sich, daß unter vWF-abbauenden Bedingungen mit der erfindungsgemäßen Protease-Präparation kein Abbau von menschlichem Fibrinogen, BSA oder Collagen aus Kälberhaut beobachtet werden konnte (siehe Fig. 11). Die reduzierte SDS-PAGE zeigte unveränderte Untereinheitsketten dieser Proteine, welche als potentielle Substrate verwendet worden sind, was darauf hindeutet, daß die erfindungsgemäße Protease eine hohe Spezifität für vWF aufweist.

Aminosäure-Analyse und Aminosäure-Sequenz von vWF und dessen Abbauprodukten:

Alle drei elektrophoretischen Banden, welche in Fig. 10 gezeigt sind, nämlich die 250-, 170- und 140-kD-Bande, wurden auf eine PVDF-Membran transferiert und einer Analyse der Aminosäurezusammensetzung und der Aminosäuresequenz unterzogen. Die Resultate sind in Tabelle 2 dargestellt und zeigten gute Übereinstimmung zwischen der Aminosäurezusammensetzung dieser drei Polypeptidbanden und den theoretischen Werten, welche ausgehend von der intakten vWF-Untereinheit, dem C-terminalen Fragment 843-2050 und dem N-terminalen Fragment 1-842 berechnet worden sind; siehe dazu EP-0 197 592. Die N-terminale Aminosäuresequenz zu einer der 250- und 140-kD-Banden war Ser-Leu-Ser-X-Arg; diese Sequenz stimmt mit der N-terminalen Sequenz der intakten vWF-Untereinheit über in. Die Analyse des größeren Abbauproduktes mit der Molmasse 170 kD ergab eine N-terminale Sequenz von Met-Val-Thr-Gly-Asn,

welche mit den Aminosäureresten 843-847 in der intakten vWF-Untereinheit übereinstimmt. Diese Daten deuten darauf hin, daß die gereinigte Protease die Peptidbindung Tyr842 mit 843 spaltet.

Tabelle 2

Aminosäure	$M_r \sim 250$ kD	vWF 1-2050	$M_r \sim 170$ kD	vWF 843-2050	$M_r \sim 140$ kD	vWF 1-842
Asp + Asn	173	187	102	108	77	79
Thr	118	116	70	78	39	38
Ser	131	141	78	80	55	61
Glu + Gln	249	237	152	139	104	98
Pro	139	136	85	86	54	50
Gly	152	137	117	86	76	51
Ala	110	104	67	60	50	44
Val	171	184	87	103	66	81
Ile	75	78	41	44	30	34
Leu	163	156	86	83	73	73
Tyr	48	49	18	22	21	27
Phe	58	56	33	32	25	24
His	53	52	28	31	19	21
Lys	87	88	45	47	39	41
Arg	95	101	49	58	38	43

Proteolytische Fragmentierung von rekombinatem vWF:

Rekombinanter vWF-Faktor (r-vWF), hergestellt gemäß FEBS-Letters 375, 259-262 (1995), mit einer Konzentration von 104 E (Ag)/ml in 20 mM TBS-Puffer, pH 8,3, wurde wie oben beschrieben, mit der
 5 erfundungsgemäßen vWF-Protease-Präparation inkubiert. Es zeigte sich bereits nach 3 h ein Verlust der höchsten Multimere unter Bildung von den plasmatischen vWF-ähnlichen Satellitenbanden. Nach 20 h waren keine Oligo- und Multimere mehr nachweisbar (siehe Fig. 12A).

Die erfundungsgemäß hergestellte Präparation mit der vWF-spezifischen Protease wies nach Kupferchel-
 10 lat-Affinitäts-Chromatographie noch eine deutlich meßbare Plasminaktivität auf (0,2 E/ml; wurde ermittelt, indem 50 µl-Probe oder Standard (humanes Plasmin der Firma Chromogenics mit 19,3 E/ml in 20 mM TBS-Puffer, pH 8,3) 1 min bei 37 °C vorgewärmt und mit 200 µl chromogenem Substrat PL1, Immuno AG (D-Cyclohexylglycyl-L-Alanyl-L-Arginin-p-Nitroanilid, 1 mM in TBS-Puffer, pH 8,3) versetzt wird, worauf die Kinetik der Freisetzung von p-Nitroanilin bei 37 °C bei 405 nm photometrisch gemessen wird). Es mußte
 15 daher ausgeschlossen werden, daß durch die Protease-Präparation ein Abbau der von Willebrand-Faktor-Multimere erfolgt, der auf das vorhandene Plasmin zurückzuführen und nicht Resultat der vWF-spezifischen Protease war.

Die Figuren 12B und 12C zeigen, daß rekombinanter vWF bei Inkubation mit der erfundungsgemäßen Protease in Gegenwart eines Plasmininhibitors (Aprotinin) und eines Proteaseinhibitors mit geringerer Spezifität für Plasmin, wie PPACK, ident abgebaut wird. Die Konzentration von Aprotinin und PPACK wurde
 20 so gewählt, daß mit chromogenem Substrat keine Proteaseaktivität von Plasmin nachgewiesen werden konnte.

Bei der Inkubation von Kryopräzipitat mit vWF-Protease (Fig. 13A) konnte über die Zeit ebenso wie beim rekombinanten vWF ein Verlust der Multimere beobachtet werden. Die Satellitenbanden zeigten bereits nach kurzer Inkubation eine Verstärkung. Durch Zusatz der Proteaseinhibitoren (Aprotinin, Fig. 13B und PPACK, Fig. 13C) konnte der Abbau nicht verhindert aber verlangsamt werden. Wenn anstatt des
 25 Kryopräzipitates (Laborpräparation 10 E (Ag)/ml in 20 mM TBS-Puffer, pH 8,3) eine dafür hergestellte Präparation der höchsten vWF-Multimere eingesetzt wurde (siehe Fig. 14A), konnte mit der erfundungsgemäßen vWF-Protease ein deutlicher Shift zu niedrigen Multimeren unter Verstärkung der Satellitenbanden nachgewiesen werden. Mit Plasmin wurde bei Verdau über Nacht sowohl plasmatischer vWF als auch
 30 rekombinanter vWF überhaupt vollständig degradiert (siehe Fig. 14B und 14D). In diesem Experiment zeigte der Abbau des rekombinanten vWF mit der erfundungsgemäßen Protease, daß die entwickelten Satellitenbanden und die zentralen Banden dem plasmatischen vWF zwar sehr ähnlich, aber unschärfer waren (Fig. 14C).

Die Inkubation von r-vWF mit Plasmin (siehe Fig. 15; wobei Plasmin auf 0,2 E/ml in 20 mM TBS-Puffer, pH 8,3, verdünnt und 1 : 1 mit der jeweiligen r-vWF-Präparation versetzt und bei 37 °C inkubiert wird) in
 35 niedrigerer Konzentration, bezogen auf das vorhandene Substrat, zeigte in der kinetischen Untersuchung einen sukzessiven Abbau der Multimere über 29 h (siehe Fig. 15A). Ein Kontrollansatz ohne Protease beweist die sonst feststellbare Stabilität des r-vWF in Lösung (siehe Fig. 15C). Bei Reduktion der Plasminkonzentration auf 1 : 10 war der Abbau von r-vWF langsamer (Fig. 15B); dies konnte durch den
 40 Zusatz von Aprotinin (siehe Fig. 16B) und PPACK (siehe Fig. 16C) verhindert werden. Die Multimerenbilder zeigten über die Zeit (ca. 20 h) keine Veränderungen im Gegensatz zur Behandlung ohne Inhibitor (siehe Fig. 16A).

Der Kontrollversuch mit Kryopräzipitat (Fig. 17) zeigt wieder eine Reduktion der hohen Multimere bei Inkubation über 8 h, der durch Zusatz von Aprotinin oder PPACK verhindert werden konnte.

Es wurde weiters untersucht, ob ein proteolytischer Abbau von r-vWF durch Inkubation mit Humanplasma erfolgte (siehe Fig. 18). Dazu wurde die r-vWF-Präparation mit gleichen Volumsteilen eines vWF-defizienten Plasmas (siehe Fig. 18A) gemischt und 48 h inkubiert, wobei zu verschiedenen Zeiten Proben
 45 gezogen wurden. Es konnte keine Veränderung des r-vWF über die Zeit nachgewiesen werden. Eine Kontrollpräparation, die Puffermedien über die selbe Zeit bei 37 °C stehengelassen wurde, zeigte ebenso
 50 keine Veränderung der Struktur (siehe Fig. 8B).

Die Analyse des r-vWF und seiner proteolytischen Abbauprodukte erfolgte in 1 %igen und 2 %igen Agarosegelen ebenfalls nach der Methode von Ruggeri et al. (Blood 57 (1981), 1140-1143). Dabei wurden die vWF-Multimere durch eine immunenzymatische Färbung nach Aihara et al., (Thromb. Haemostas. 55 (1986), 263-267) sichtbar gemacht. Als Primär-Antikörper wurde ein Kaninchenanti-von Willebrand-Faktor-Antiserum (von der Fa. Dakopatts, Glostrup, Dänemark) verwendet, als sekundärer Antikörper diente ein
 55 alkalischer Phosphatase-konjugierter affinitätsgereinigter Ziegen-anti-Kaninchen IgG H + L-Antikörper (von der Fa. Axell Accurate Chemical and Scientific Corp., Westburg, N.Y.). Die Färbung der Proteinbande erfolgte mittels des Nitroblautetrazolium/bromchlor-indolyl-phosphat-Substratsyst ms.

Patentansprüche

1. Pharmazeutische Zusammensetzung, enthaltend eine Multimerase mit den folgenden Eigenschaften:
 - a) sie besitzt eine mittelbare bzw. unmittelbare proteolytische Aktivität und setzt von Willebrand-Faktor (vWF) mit einer Singulettstruktur um zu vWF mit einer Satellitenstruktur,
 - b) sie ist aktiv in Gegenwart des Serinprotease-Inhibitors DFP oder des Calpain-Protease-Inhibitors Z-Leu-Leu-Tyr-CHN₂, und
 - c) sie ist zur Inaktivierung bzw. Abreicherung von Viren behandelt.
2. Pharmazeutische Zusammensetzung nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, daß die Multimerase eine optimale proteolytische Aktivität bei einem pH im Bereich von 7 bis 10 aufweist.
3. Pharmazeutische Zusammensetzung nach Anspruch 1 oder 2, **dadurch gekennzeichnet**, daß die Multimerase in einer Fraktion zur Verfügung gestellt wird, die nach Gelfiltration einer Plasma- oder Serumfraktion entsprechend dem Molekulargewicht von mehr als 200 kD, vorzugsweise im Bereich von etwa 300 kD, erhalten wird.
4. Pharmazeutische Zusammensetzung nach einem der Ansprüche 1 bis 3, **dadurch gekennzeichnet**, daß die Multimerase gegenüber Plasma in mindestens 1000-fach, vorzugsweise in mindestens 10 000-fach, angereicherter Form vorliegt.
5. Pharmazeutische Zusammensetzung nach einem der Ansprüche 1 bis 4, **dadurch gekennzeichnet**, daß die Multimerase eine spezifische Aktivität von mindestens 10 E/mg Protein in Gegenwart eines Serinprotease-Inhibitors aufweist.
6. Pharmazeutische Zusammensetzung nach einem der Ansprüche 1 bis 5, **dadurch gekennzeichnet**, daß die Multimerase in Gegenwart von zweiwertigen Metallionen, wie Erdalkali-Ionen, aktiv ist.
7. Pharmazeutische Zusammensetzung nach einem der Ansprüche 1 bis 6, **dadurch gekennzeichnet**, daß die Multimerase eine Aktivität aufweist, die durch Scherkräfte, reduzierte Ionenstärke oder chaotrope Mittel erhöht werden kann.
8. Pharmazeutische Zusammensetzung nach einem der Ansprüche 1 bis 7, **dadurch gekennzeichnet**, daß die Multimerase eine verstärkte Aktivität gegenüber modifiziertem vWF, wie partiell denaturiertem vWF oder vWF mit einer Konformationsänderung, aufweist.
9. Pharmazeutische Zusammensetzung nach einem der Ansprüche 1 bis 8, **dadurch gekennzeichnet**, daß die Multimerase zur Inaktivierung von Viren mit Tensiden und/oder Hitze behandelt ist.
10. Pharmazeutische Zusammensetzung nach einem der Ansprüche 1 bis 9, **dadurch gekennzeichnet**, daß die Multimerase zur Abreicherung von Viren nanofiltriert ist.
11. Verwendung einer Multimerase gemäß einem der Ansprüche 1 bis 10, zur Herstellung einer Präparation zur Prophylaxe und Therapie von Thrombosen oder thromboembolischen Krankheitszuständen.
12. Verwendung nach Anspruch 11, zur Herstellung einer Präparation zur Prophylaxe und Therapie von einem supranormalen vWF-Gehalt oder erhöhten Anteil von hochmolekularem vWF.
13. Verwendung nach Anspruch 12, zur Herstellung einer Präparation zur Prophylaxe und Therapie eines supranormalen vWF-Antigen-Levels oder einer supranormalen vWF-Aktivität, insbesondere zur Prophylaxe und Therapie der primären haemostatischen Aktivität, aber auch der Bindungsaktivität am Subendothel, an Thrombozyten, an Thrombozytenadhäsionsproteinen, wie GPIb und GPIIb/IIIa, an Collagen, an Faktor VIII und, an Heparin.
14. Verwendung nach einem der Ansprüche 11 bis 13, zur Herstellung einer Präparation zur Prophylaxe und Therapie von thrombotischer thrombozytopenischer Purpura, Henoch-Schönlein-Purpura, Präeklampsie, neonataler Thrombozytopenie oder haemolytischurämischem Syndrom.

15. Verfahren zur Herstellung einer pharmazeutischen Präparation gemäß einem der Ansprüche 1 bis 10, **dadurch gekennzeichnet**, daß ein Multimerase-haltiges Ausgangsmaterial durch chromatographische Methoden aufgereinigt wird und anschließend nach bekannten Methoden zu einem pharmazeutischen Präparat fertiggestellt wird.
16. Verfahren nach Anspruch 15, **dadurch gekennzeichnet**, daß das Multimerase-haltige Ausgangsmaterial durch ein entsprechendes Expressionssystem hergestellt wird.
17. Verfahren zur Bestimmung der proteolytischen Aktivität einer Multimerase gemäß einem der Ansprüche 1 bis 10, durch Inkubieren einer Fraktion, enthaltend das Protein, mit einem vWF, der eine Singulettstruktur aufweist, und Bestimmen der Umsetzungsrate des vWF.
18. Verfahren zur Bestimmung der proteolytischen Aktivität einer Multimerase gemäß einem der Ansprüche 1 bis 10, durch Inkubieren einer Fraktion, enthaltend das Protein, mit einem biologisch aktiven vWF in Gegenwart eines Serinprotease-Inhibitors und Bestimmen des Ausmaßes der Inaktivierung des vWF.
19. Verfahren zur Bestimmung der proteolytischen Aktivität einer Multimerase gemäß einem der Ansprüche 1 bis 10, durch Inkubieren einer Fraktion, enthaltend das Protein, mit einem chromogenen Substrat, welches homolog zur vWF-Sequenz, enthaltend die Peptidbindung 842Tyr-843Met, ist und eine chromogene Gruppe umfaßt, wobei das Substrat durch die proteolytische Aktivität gespalten und ein Chromophor gebildet wird, und Bestimmen der Farbentwicklung.
20. Verfahren zur Herstellung von Antikörpern gegen eine Multimerase gemäß einem der Ansprüche 1 bis 10, unter Verwendung der gereinigten Multimerase als Immunogen.
21. Antikörperpräparation, enthaltend Antikörper, die gegen eine Multimerase nach einem der Ansprüche 1 bis 10 gerichtet ist.
22. Antikörperpräparation nach Anspruch 21, **dadurch gekennzeichnet**, daß die Antikörper an einer festen Phase immobilisiert sind.
23. Verwendung einer Antikörperpräparation nach Anspruch 21 oder 22 zum Nachweis oder zur Reinigung der Multimerase nach einem der Ansprüche 1 bis 10.
24. Lagerstabile, pharmazeutische Präparation, enthaltend einen vWF mit permanentem Multimerenmuster.
25. Präparation nach Anspruch 24, weiters enthaltend Faktor VIII, ein Faktor VIII-Derivat oder eine Faktor VIII-Mutante.
26. Präparation nach Anspruch 24 oder 25, **dadurch gekennzeichnet**, daß der vWF ein nativer vWF, rvWF, ein vWF-Derivat bzw. ein vWF-Fragment oder eine vWF-Mutante ist, vorausgesetzt, daß die Tyr842-Met843-Peptidsequenz enthalten ist.
27. Präparation nach einem der Ansprüche 24 bis 26, **dadurch gekennzeichnet**, daß eine Multimerase-Aktivität im Präparat reduziert ist, insbesondere auf einen Gehalt von weniger als die Nachweisgrenze.
28. Präparation nach Anspruch 27, **dadurch gekennzeichnet**, daß die Multimerase-Aktivität durch Inhibition der Multimerase oder Abreichern der Multimerase reduziert ist.
29. Präparation nach einem der Ansprüche 24 bis 28, **dadurch gekennzeichnet**, daß sie im flüssigen, flüssig-tiefgefrorenen oder lyophilisierten Zustand lagerstabil ist.

Hiezu 18 Blatt Zeichnungen

FIG. 1

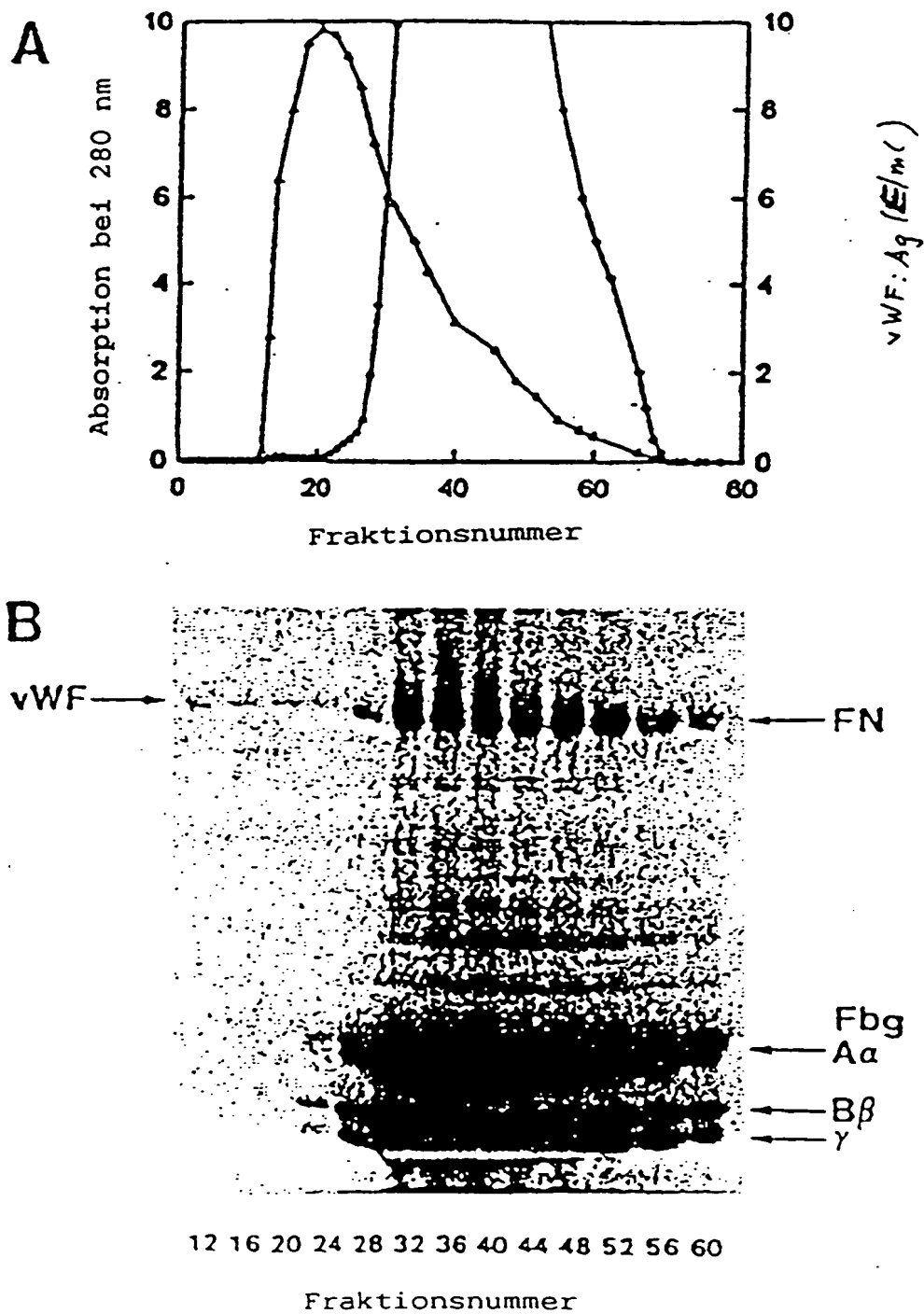
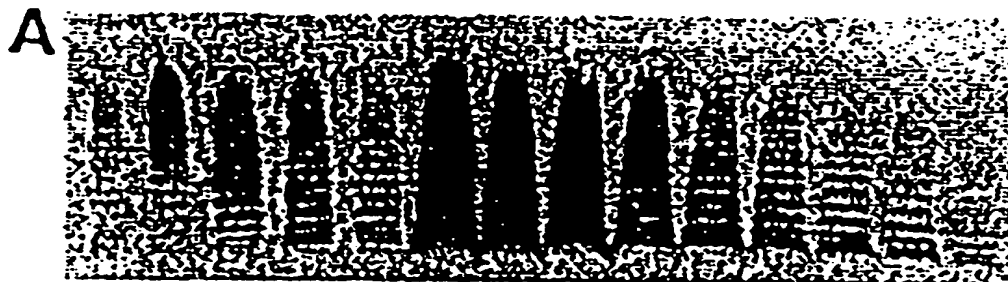
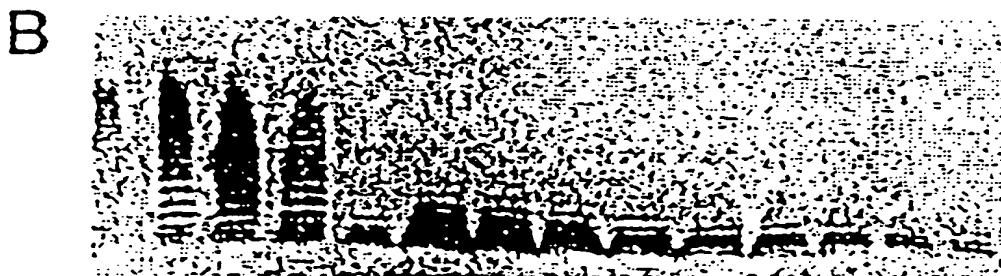


FIG. 2



11 12 16 20 24 24 28 32 36 40 44 48 52 56
1/10 1/10 1/10 1/10

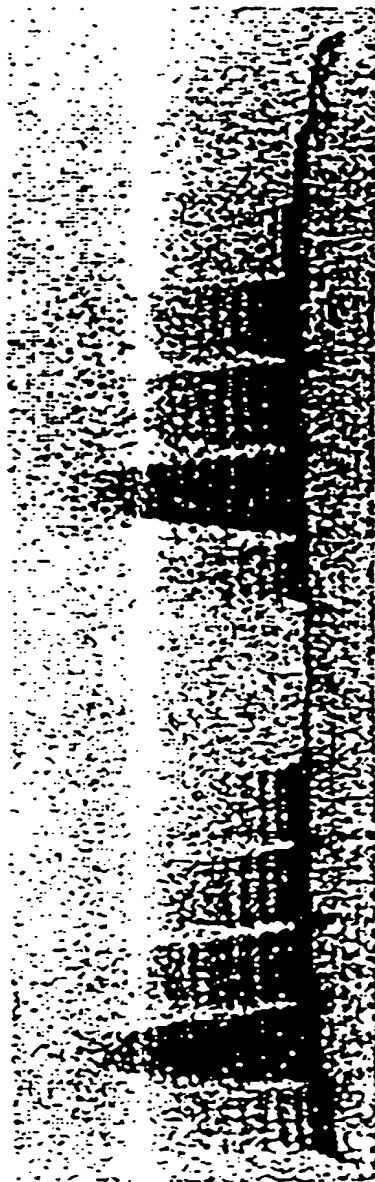
Fraktionsnummer



11 12 16 20 24 24 28 32 36 40 44 48 52 56
1/10 1/10 1/10 1/10

Fraktionsnummer

FIG. 3



NaCl (M)	0	0.15	0.15	0.10	0.05	0.015	0	0	0.15	0.15	0.10	0.05	0.015	0
Harnstoff (M)	0	0	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1
DFP (mM)	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1

FIG. 4

lysierte Plättchen (x 15): Sediment
lysierte Plättchen (x 15): Überstand

PPP

Kryopräzipitat-freies PPP

Kryopräzipitat (x 15)

defibriniertes PPP

Serum

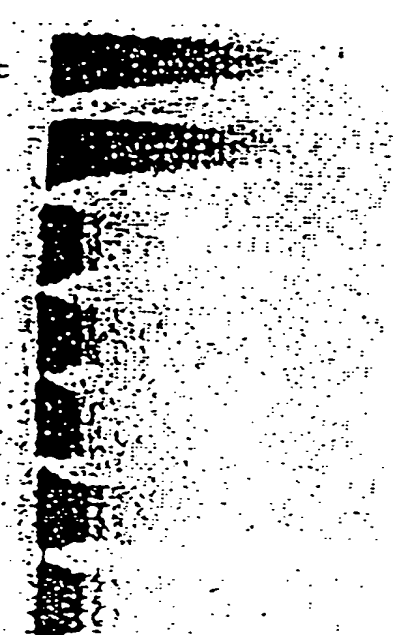


FIG. 5

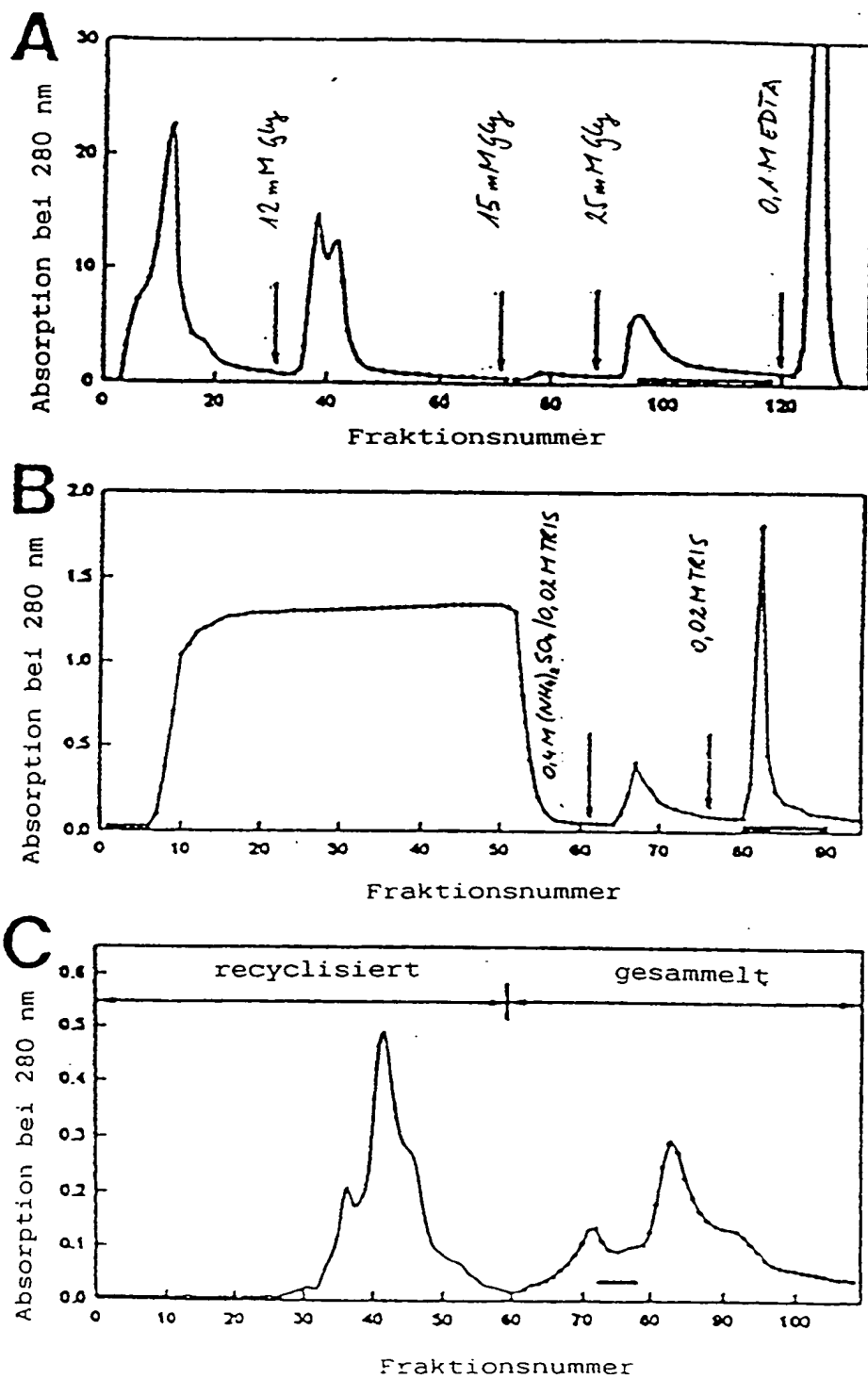


FIG. 6

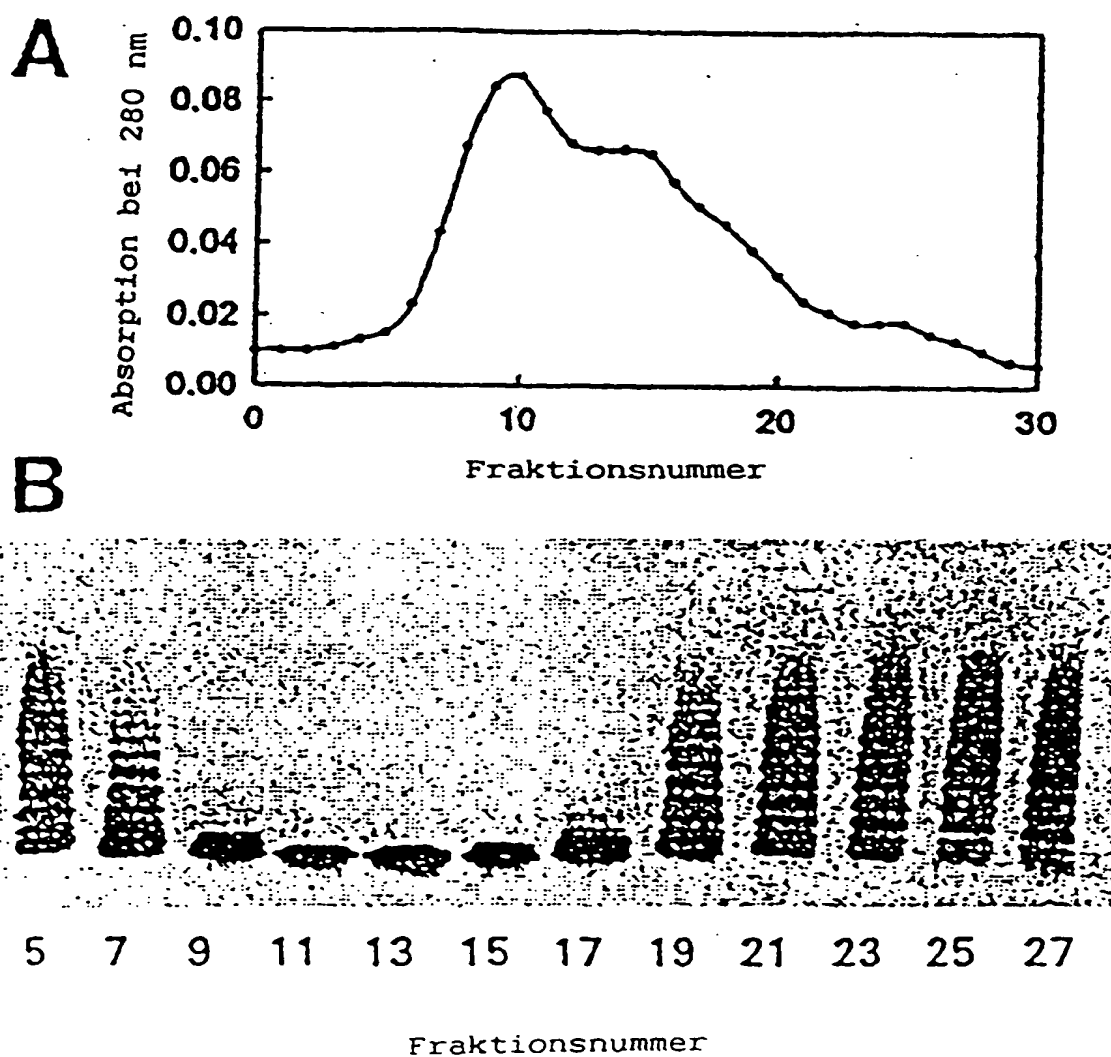


FIG. 7

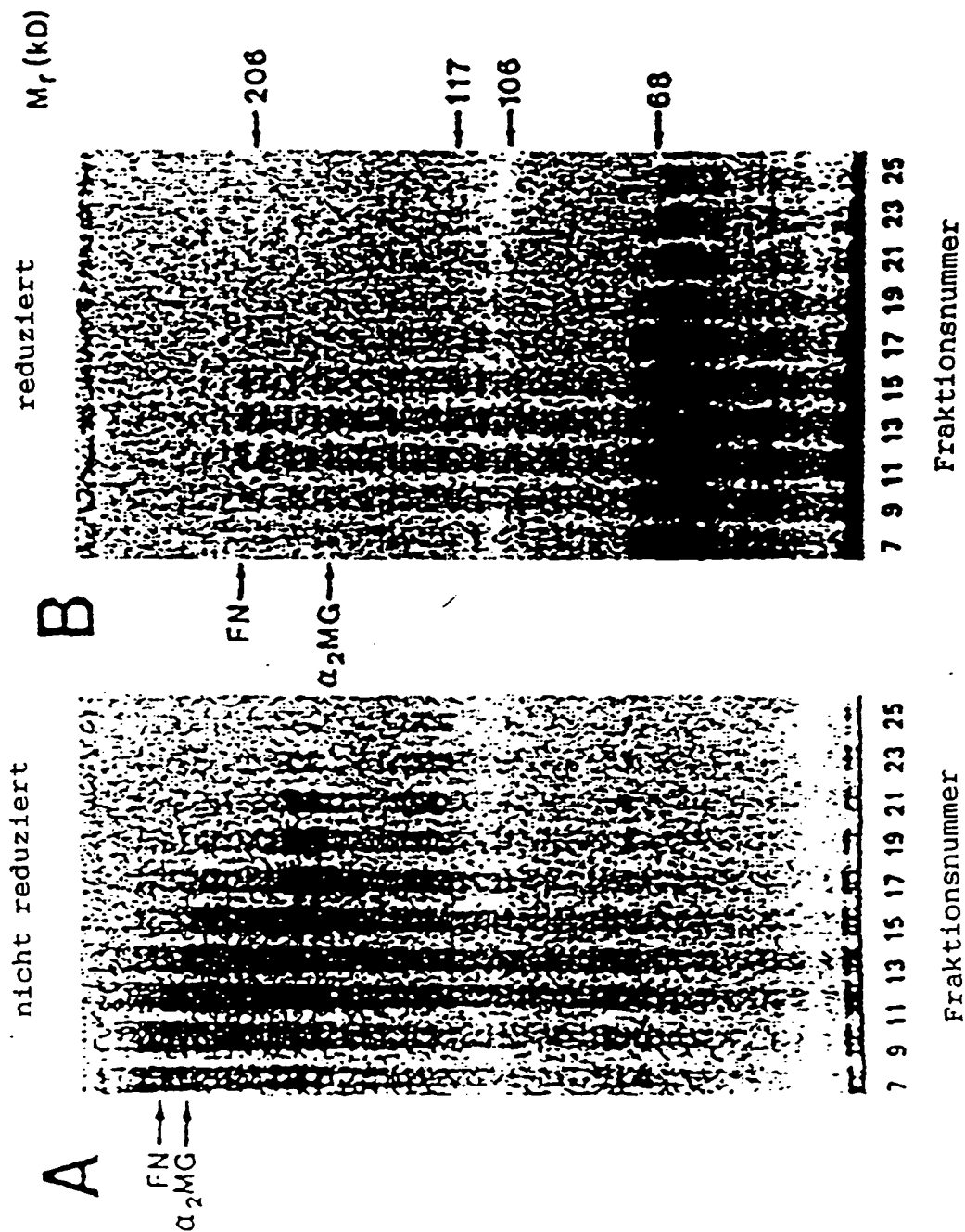


FIG. 8

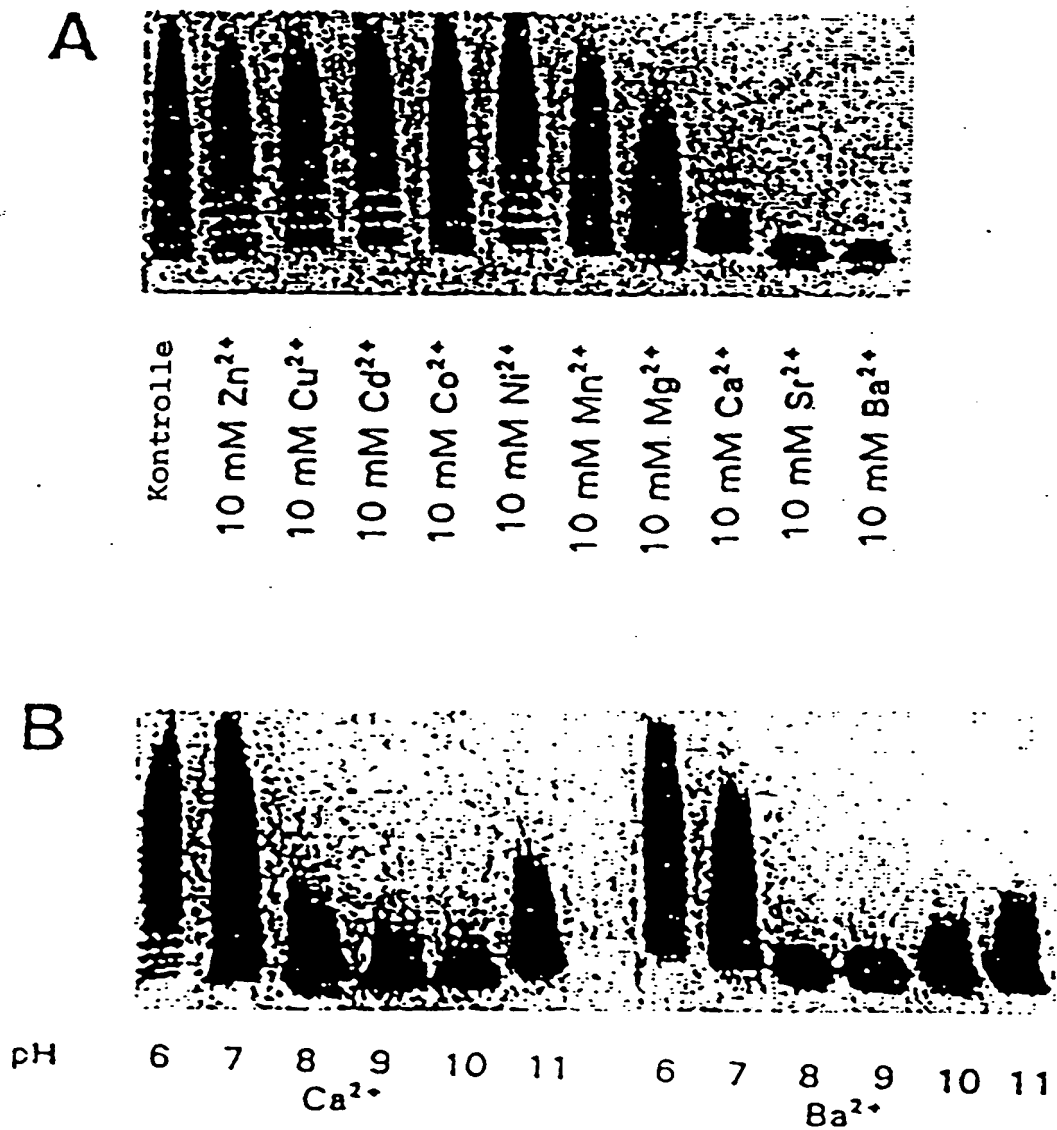


FIG. 9

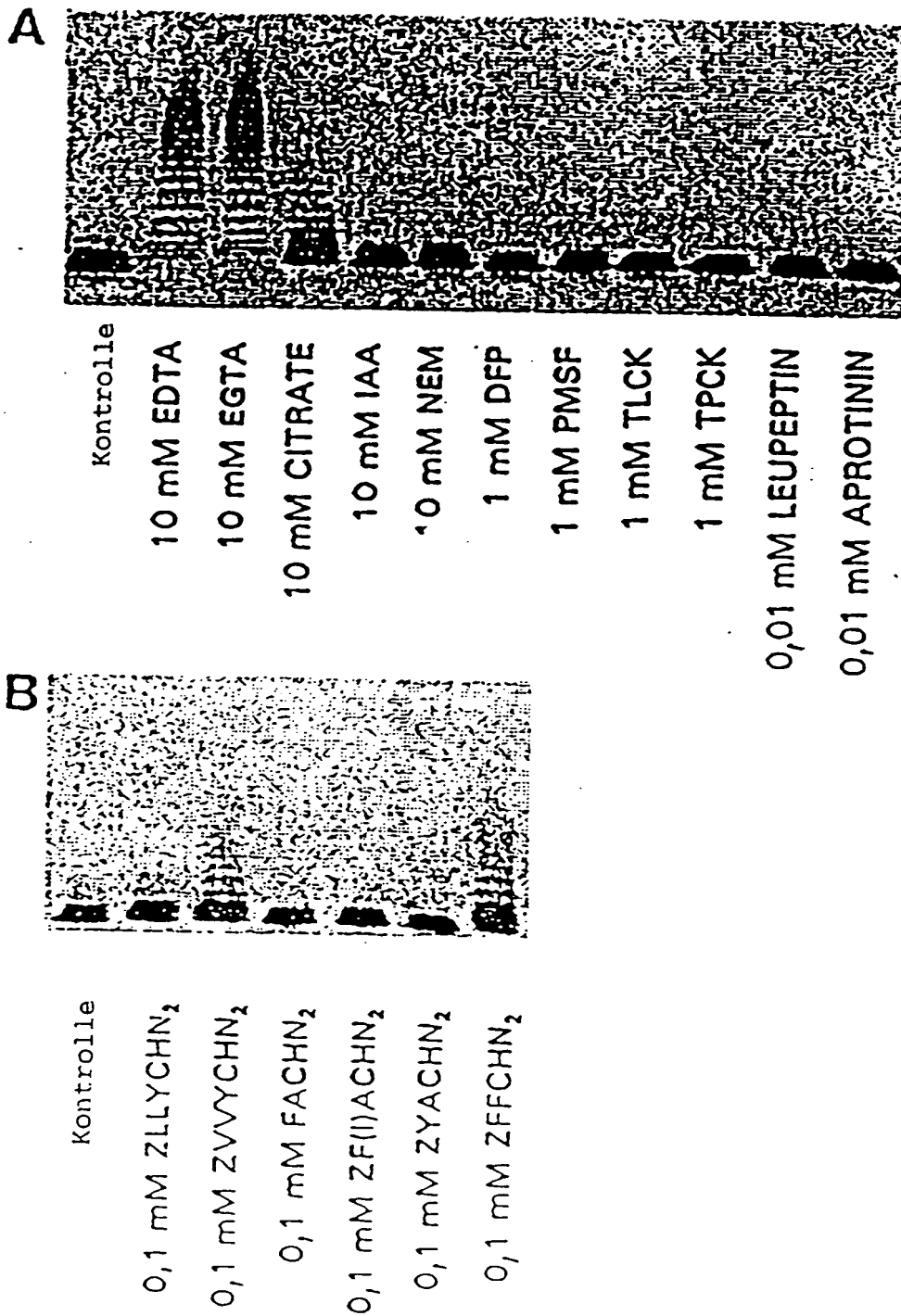


FIG. 10

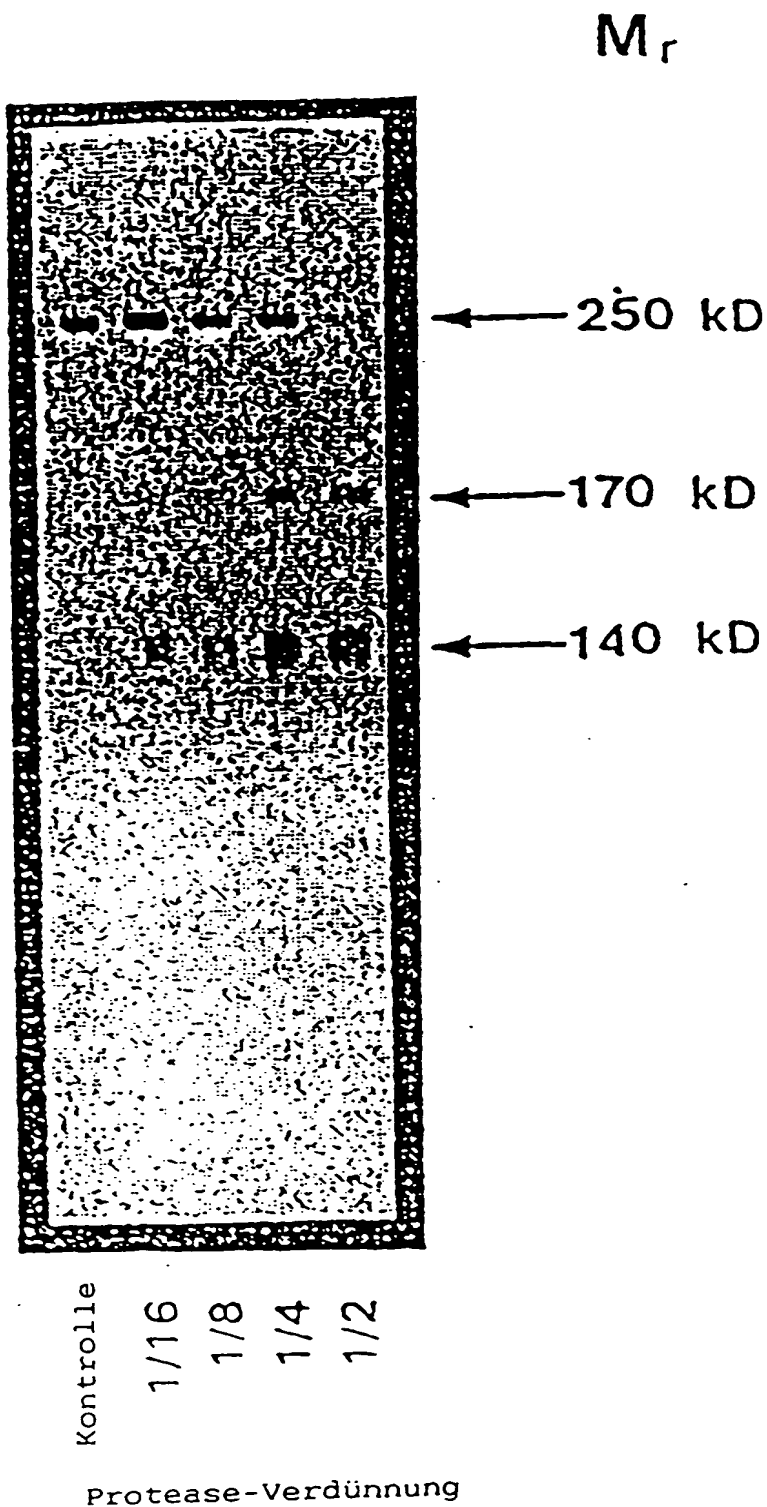
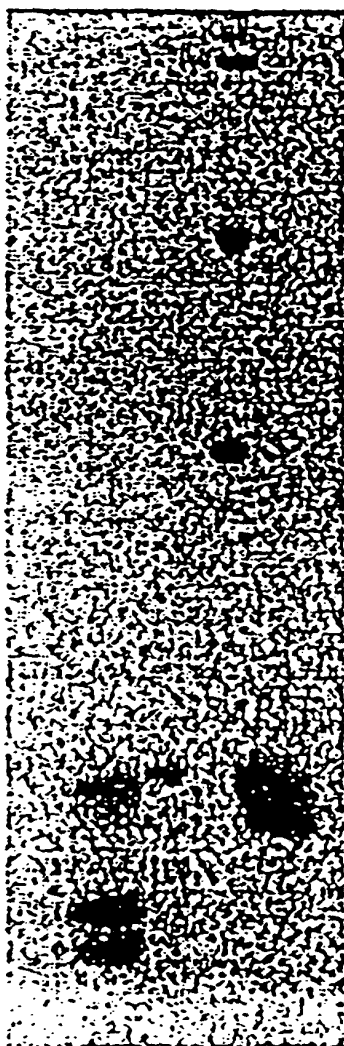


FIG. 11

24h 37°C

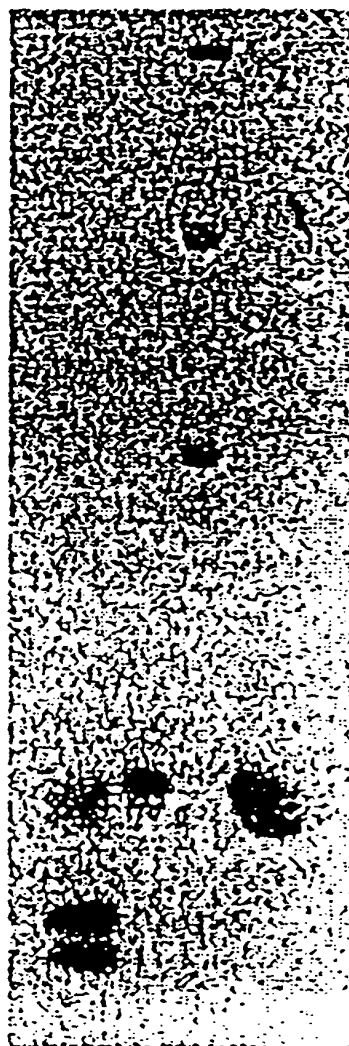
Kontrolle



A B C D

24h 37°C

+ Protease



A B C D

FIG. 12

Abbau von rvWF

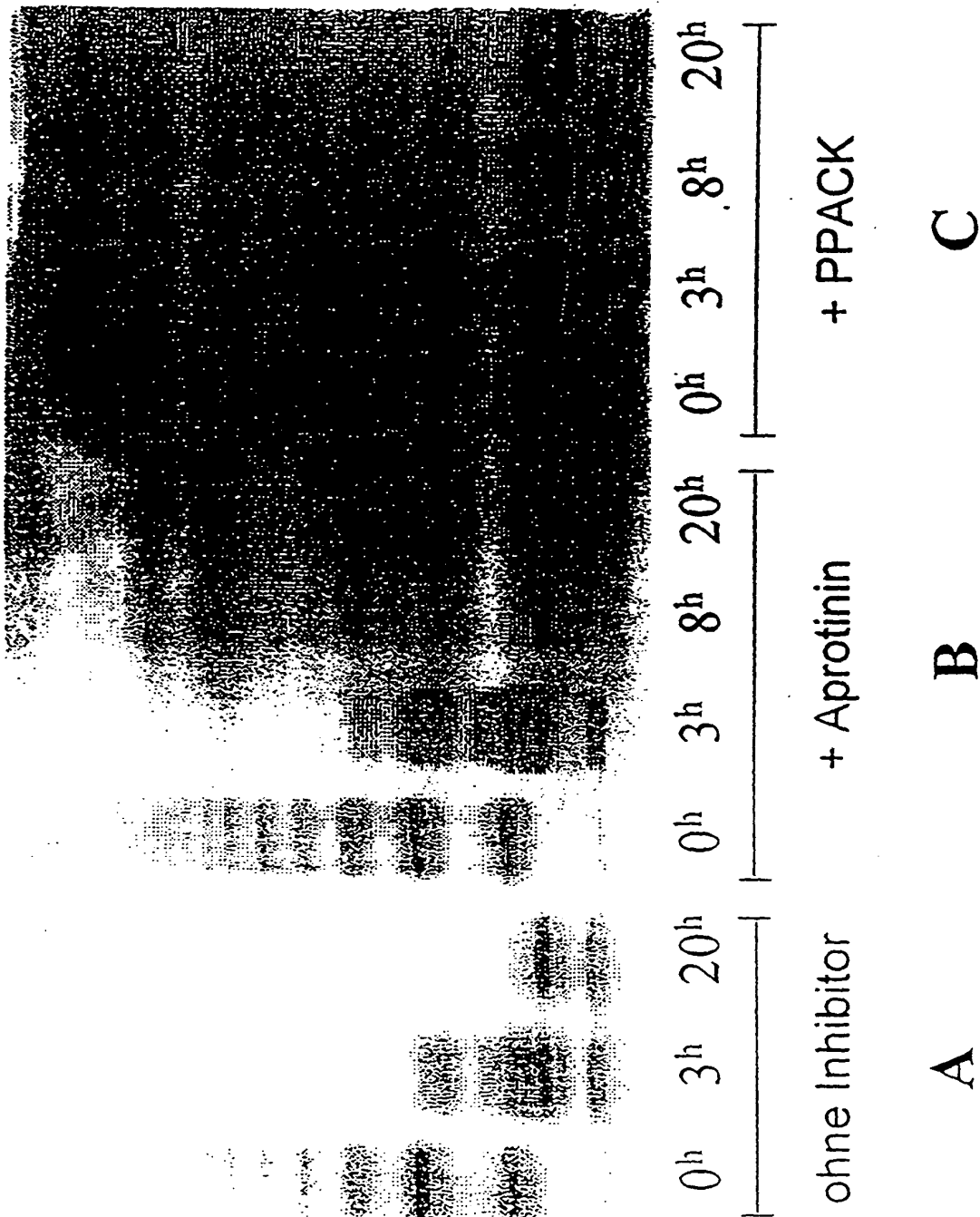


FIG. 13

Abbau von vWF aus Kryopräzipitat

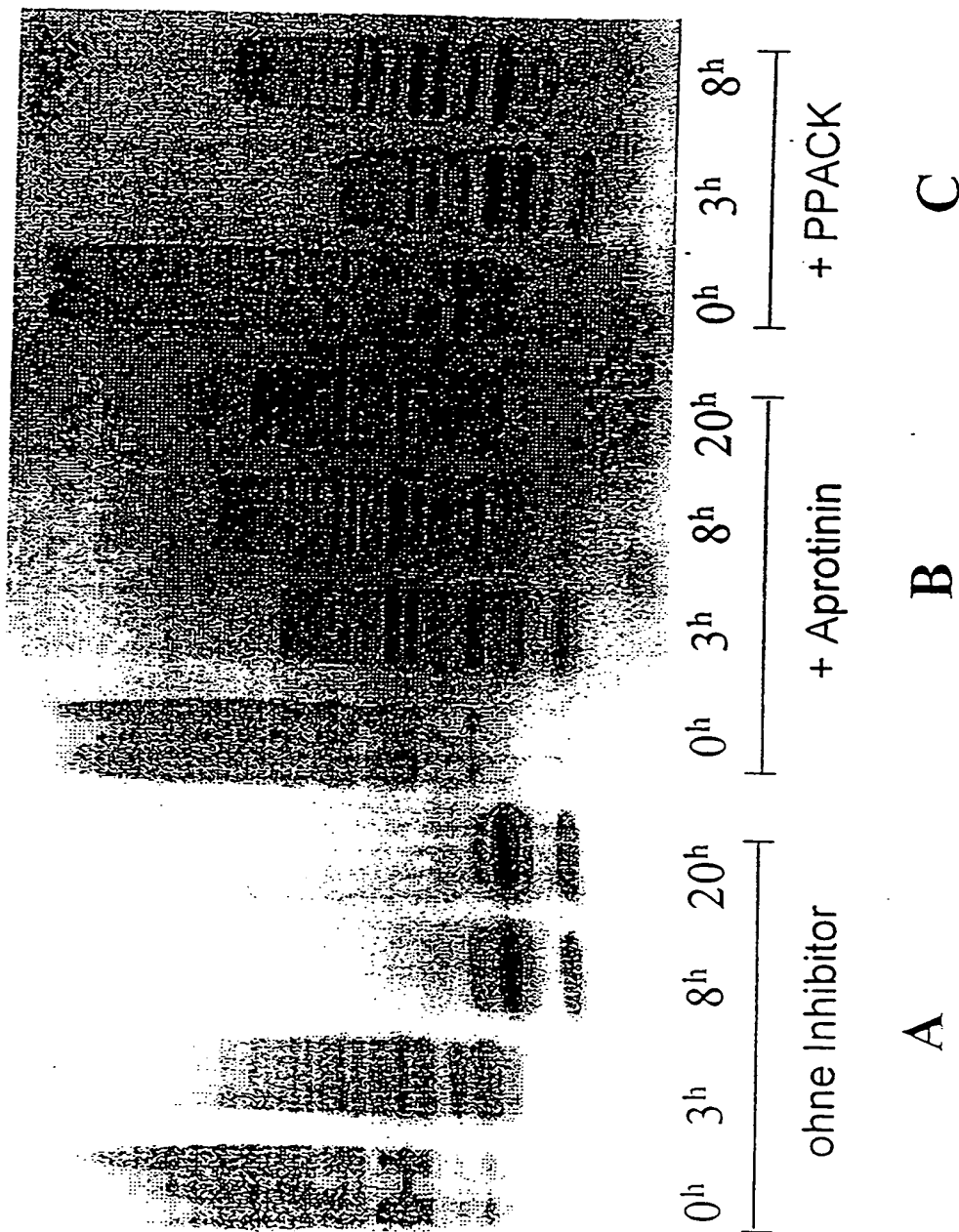


FIG. 14

Abbau von vWF-Hochmultimeren und rvWF

- vWF-
Hochmultimere
- A nach
"vW-Multimerase"
- B nach Plasmin
- rvWF
- C nach
"vW-Multimerase"
- D nach Plasmin

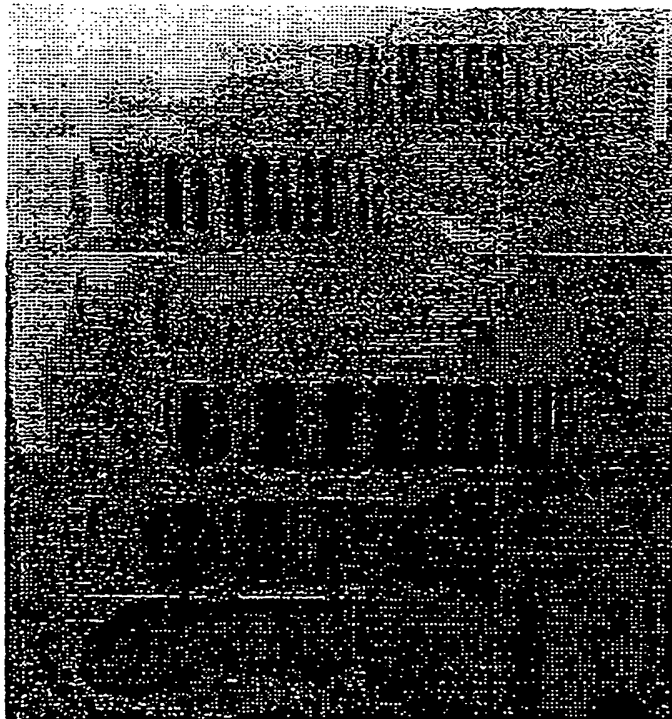


FIG. 15 Abbau von vWF mit Plasmin (Kinetik)

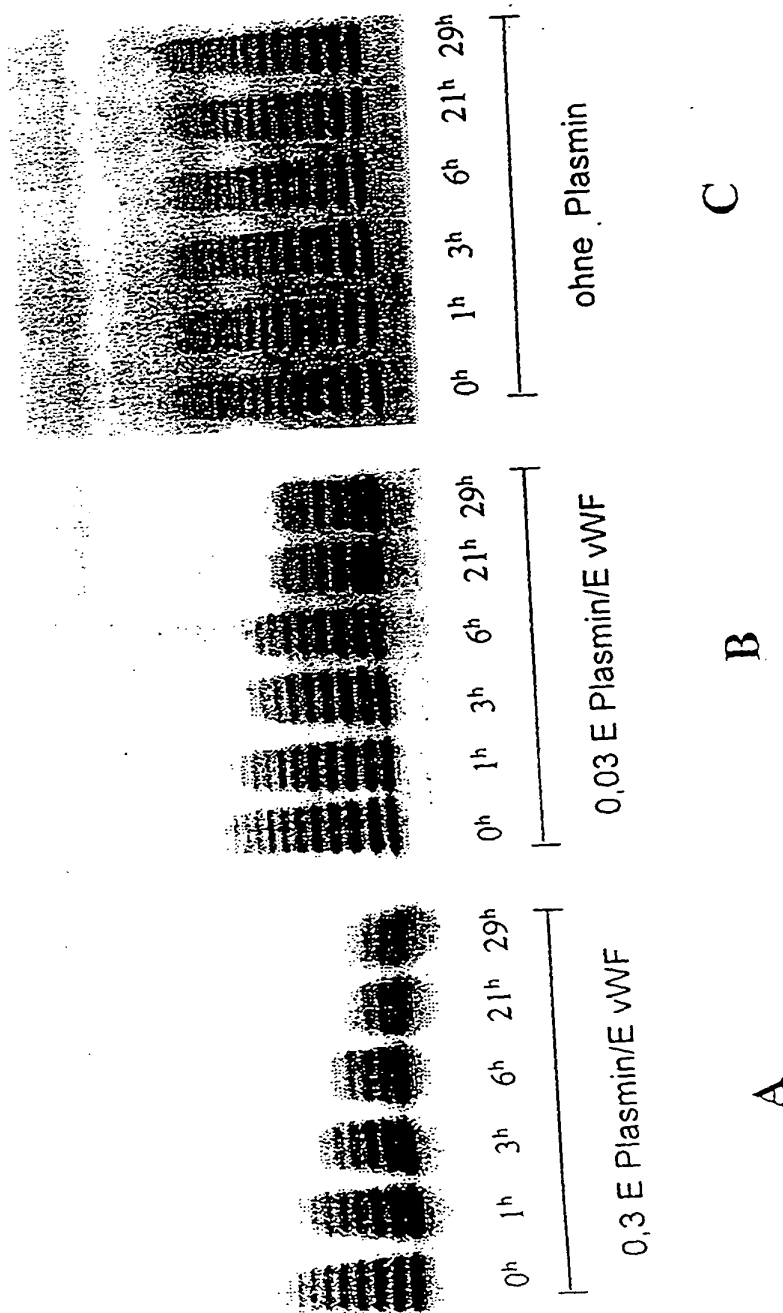


FIG. 16

Abbau von rvWF mit Plasmin ± Inhibitoren

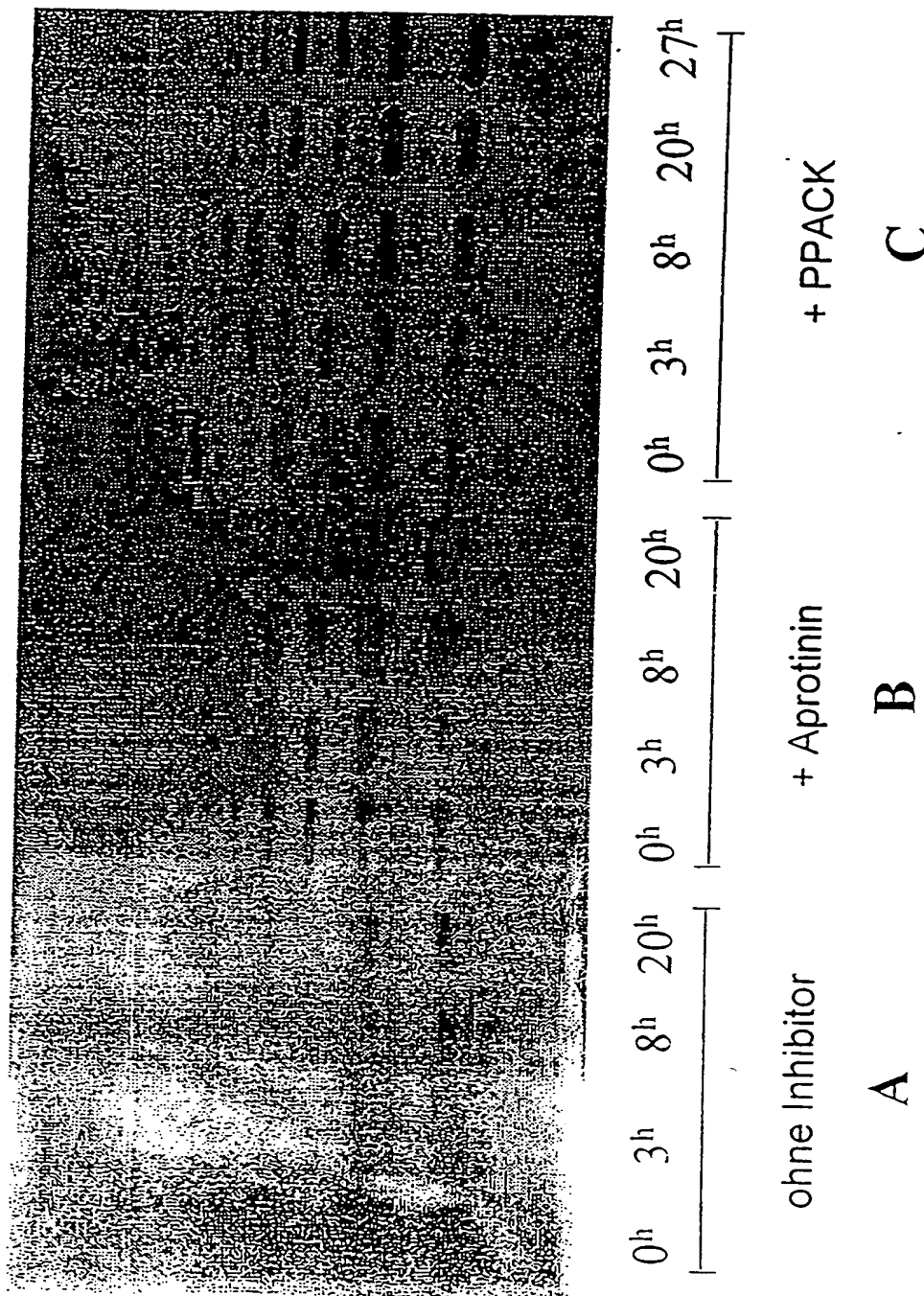


FIG. 17 Abbau von vWF aus Kryopräzipitat mit Plasmin

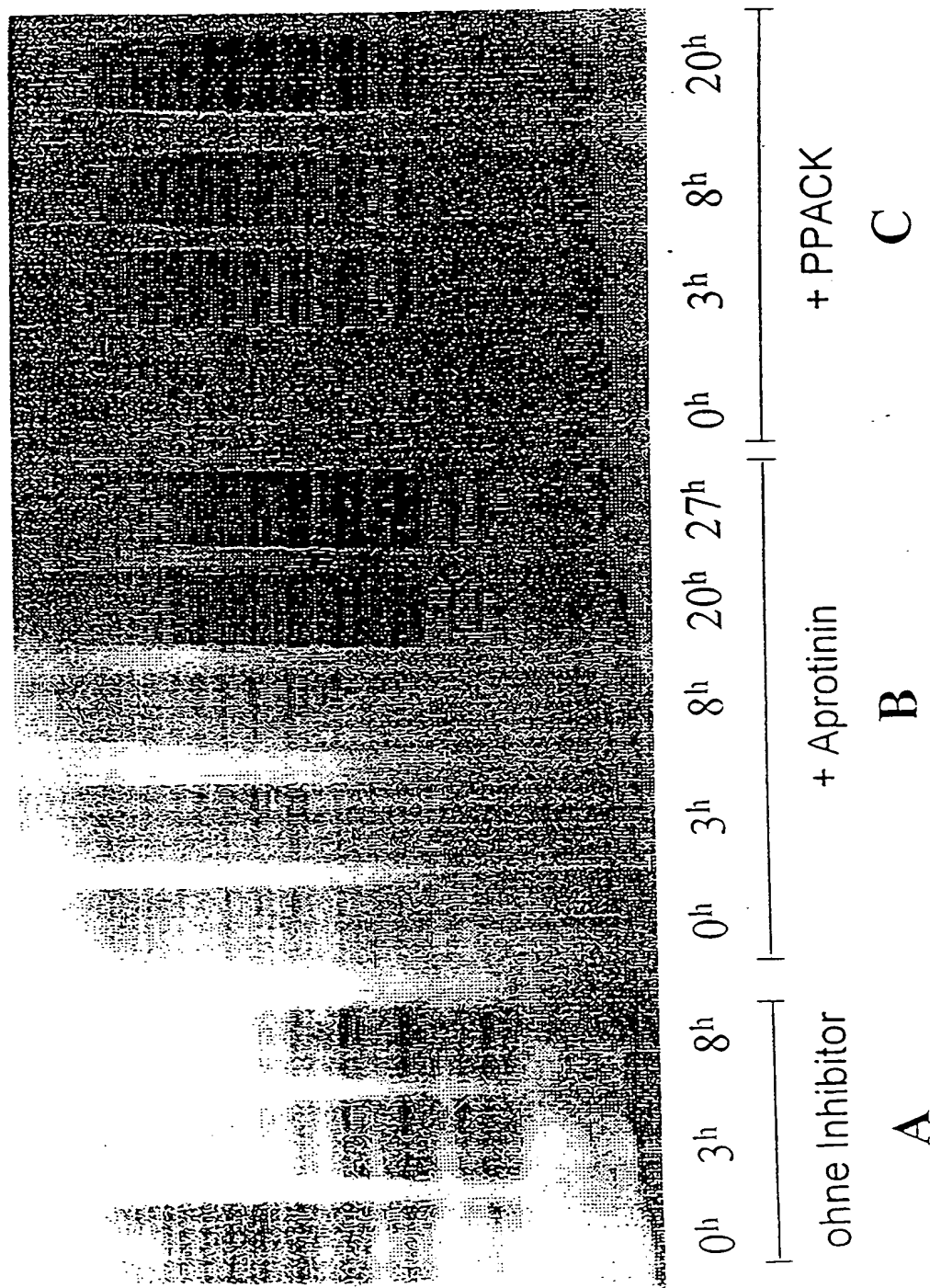
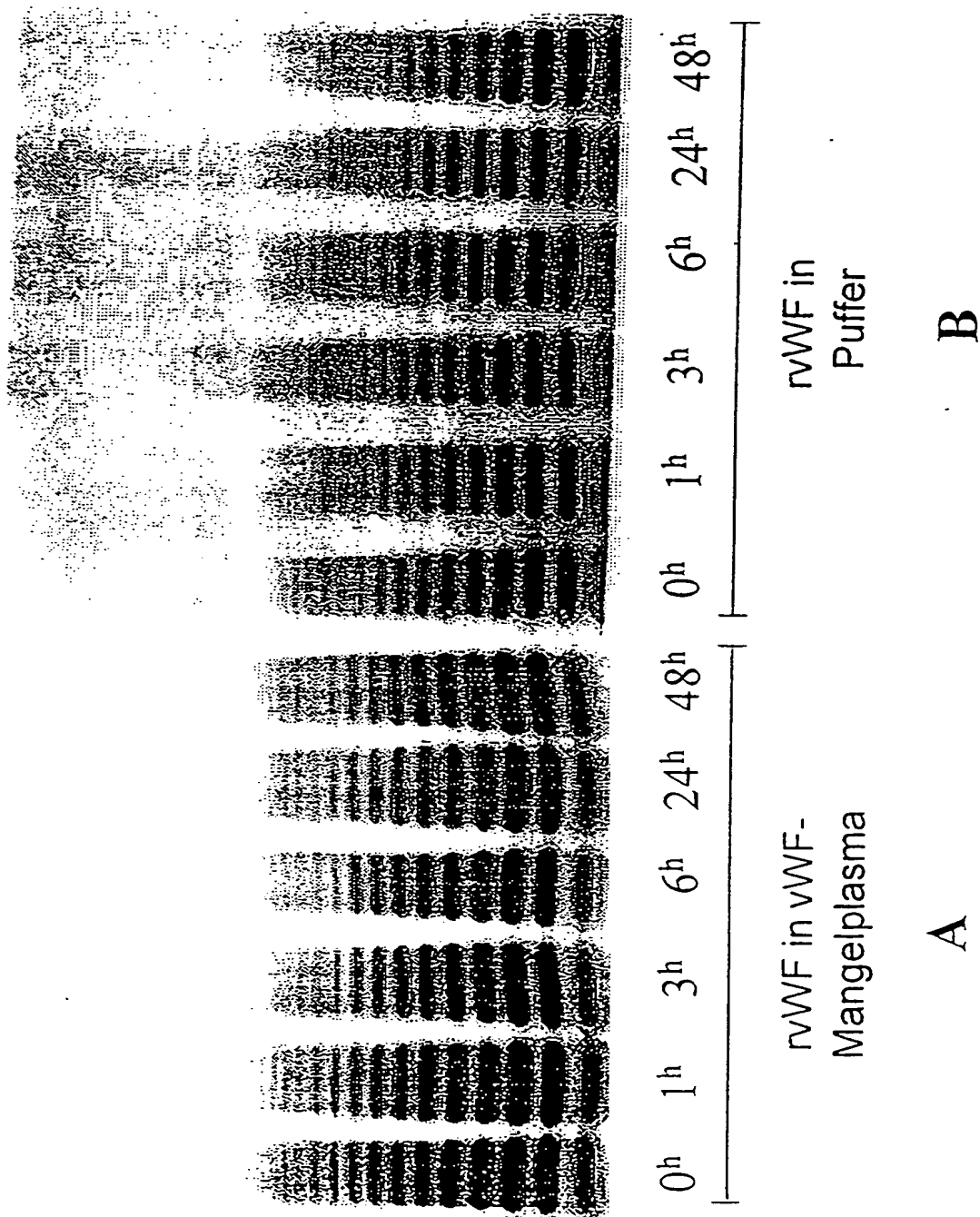


FIG. 18
rvWF-Inkubation in vWF-defizientem, humanem Plasma



1875